

# Der Einfluss der HO-1 Expression auf die Schwangerschaftskomplikationen spontaner Abort und Präeklampsie

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Andre Sascha Sollwedel  
geboren am 09.05.1975 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ana Zenclussen
2. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
3. Prof. Dr. Richard Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2007

*Meinen Eltern gewidmet*

# **Der Einfluss der HO-1 Expression auf die Schwangerschaftskomplikationen spontaner Abort und Präeklampsie**

<b>1. Abkürzungen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
2.1 Die Schwangerschaft.....	4
2.2 Aufbau und Funktion der Plazenta.....	5
2.3 Hypothesen zur Akzeptanz des Feten.....	8
2.4 Abort.....	12
2.5 Präeklampsie.....	13
2.6 Mausmodelle für spontanen Abort und Präeklampsie.....	14
2.6.1 Mausstämme.....	14
2.6.2 Das Mausmodell für spontanen Abort CBA/J x DBAJ/2J.....	14
2.6.3 Das Mausmodell für Präeklampsie.....	15
2.7 Die Hämoxygenase.....	16
2.7.1 Formen der Hämoxygenase.....	17
2.7.2 Funktion der Hämoxygenase.....	17
2.7.2 Die Rolle von HO bei Transplantationen.....	18
2.7.2 Die Funktion von HO in Schwangerschaften.....	19
2.8 Schwangerschaftsimmunologie.....	21
2.8.1 Die Rolle der T-Zellen in der Immunantwort.....	22
2.8.2 Das Th1/Th2/Th3 Paradigma in der Schwangerschaft und seine Widersprüche...	23
2.8.3 HO-1 und dessen Interaktion mit dem Immunsystem.....	25
2.9 Stickstoffoxid-Synthase.....	26
2.9.1 Funktion von Stickstoffoxid und Stickstoffoxid-Synthase im Rahmen der Schwangerschaft.....	26
2.9.2 Funktion von NOS während der Schwangerschaft.....	27
2.9.3 Interaktion zwischen HO-1 und NOS.....	28
2.10 Apoptose.....	29
2.10.1 Apoptose im Laufe der Schwangerschaft.....	30
2.10.2 Die Einfluss von HO-1 auf der Apoptose.....	31
2.11 Ziel der Arbeit.....	32

<b>3. Material.....</b>	<b>33</b>
3.1 Chemikalien und Lösungen.....	34
3.2 Angesezte Lösungen.....	35
3.3 Enzyme, Antikörper und andere biologisch aktive Substanzen.....	37
3.4 Gebrauchswaren.....	39
3.5 Laborgeräte.....	40
3.6 Tiere und Tierzubehör.....	41
 <b>4. Methoden.....</b>	 <b>42</b>
4.1 Tierexperimentelle Methoden.....	42
4.1.1 Tierhaltung.....	42
4.1.2 Verpaarung der Mäuse.....	42
4.1.3 Tiermodell für den spontanen Abort.....	42
4.1.4 Tiermodell für Präeklampsie.....	44
4.1.5 Präparation der Mäuse und Probengewinnung.....	46
4.1.6 Blutdruckmessung.....	46
4.1.7 Lymphozytenisolierung aus der Dezidua.....	47
4.1.8 Lymphozytenisolierung aus der Milz.....	48
4.1.9 Generierung von Th1-Zellen.....	48
4.2 Durchflusszytometrie.....	49
4.3 Histochemie.....	50
4.3.1 Paraffineinbettung von Gewebe.....	50
4.3.2 Immunhistochemie (IHC).....	50
4.3.3 TUNEL ( <i>Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i> ).....	52
4.4 Real-Time RT-PCR.....	53
4.4.1 RNA-Isolation aus Plazenta-, Dezidua- und Nierengewebe.....	53
4.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	54
4.4.3 Reverse Transkription.....	55
4.4.4 Real-Time RT-PCR mit Sonde.....	55
4.4.5 Real-Time RT-PCR mit SYBER Green.....	57
4.4.6 Primeretablierung für eNOS und iNOS.....	57
4.5 Proteinanalysen.....	58
4.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes.....	58

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
4.5.3 Auftrennung von Proteinen durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
4.5.4 Western-Blot.....	59
4.6 Statistik.....	61
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
5.1 Untersuchungen von HO-1 in einem Mausmodell für spontanen Abort.....	62
5.1.1 Abortraten von normal schwangeren Mäusen im Vergleich zum Mausmodell für Fehlgeburt.....	62
5.1.2 HO-1 und HO-2 Expression im Mausmodell für spontanen Abort.....	63
5.1.2.1 Immunhistochemische Analysen der Plazenta.....	63
5.1.2.2 Untersuchungen der HO-1 und HO-2 Expression mittels Western-Blot....	64
5.1.3 Die Th1 und Th2 Zytokin-Produktion beim murinen spontanen Abort.....	65
5.1.4 iNOS und eNOS Expression im Mausmodell für spontanen Abort .....	66
5.1.4.1 Immunhistochemische Analyse der Plazenta.....	66
5.1.4.2 Western-Blot Analyse von iNOS und eNOS.....	67
5.2 Induktion von HO-1 bzw. Hemmung von HO-1 und HO-2 in dem Mausmodell für einen spontanen Abort.....	68
5.2.1 Verminderte Abortraten in Co-PP behandelten Tieren.....	69
5.2.2 HO-1 und HO-2 Expression nach Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP.....	70
5.2.2.1 Untersuchungen von HO-1 und HO-2 mittels IHC bei Mäusen die mit Co-PP bzw. Zn-PP behandelt wurden.....	70
5.2.2.2 HO-1 und Ho-2 Western-Blot Analyse.....	73
5.2.2.3 RT-PCR Analyse von HO-1.....	74
5.2.3 Th1 und Th2 Zytokinproduktion nach Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP.....	75
5.2.3.1 Durchflusszytometrie-Analyse der Dezidua aus Tieren des murinen Abortmodells am Tag 8 der Schwangerschaft.....	75
5.2.3.2 Durchflusszytometrie-Analyse der Dezidua und Milz aus Mäusen des spontanen Abortmodells am Tag 14 der Schwangerschaft.....	76
5.2.3.3 Real-time RT-PCR von TNF- $\alpha$ und TGF- $\beta$ am Tag 8 und 14 der Schwangerschaft.....	78
5.2.4 iNOS und eNOS Expression nach der Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP oder Zn-PP.....	80

5.2.4.1 Proteinexpression-Analyse von iNOS und eNOS mittels IHC am Tag 14 der Schwangerschaft.....	80
5.2.4.2 iNOS und eNOS Proteinexpression-Analyse mittels Western-Blot am 14ten Tag der Schwangerschaft.....	81
5.2.4.3 Realtime RT-PCR von iNOS und eNOS nach der Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP am 8 und 14 Tag der Schwangerschaft.....	82
5.2.5 Beeinflussung der Apoptose nach der Behandlung mit Co-PP bzw. Zn-PP.....	83
5.2.5.1 TUNEL-Analyse in der Plazenta von Co-PP bzw. Zn-PP behandelten Mäusen.....	83
5.3 HO in dem Mausmodell für Präeklampsie.....	84
5.3.1 Die Präeklampsie-Gruppe und die Normale Schwangerschaftsgruppe zeigen keine Unterschiede in der Implantationsrate.....	84
5.3.2 Blutdruckverlauf bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen.....	85
5.3.3 Histologische Veränderung in der Niere und der Plazenta bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen.....	86
5.3.4 HO Expression in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen.....	88
5.3.4.1 HO Expression in plazentalen Zellen.....	88
5.3.5.2 RT-PCR Analyse von HO-1 in der Plazenta und der Dezidua.....	89
5.3.5 Th1/Th2 Zytokinproduktion in der Dezidua im Mausmodell für Präeklampsie...	90
5.3.6 Einfluss einer Co-PP oder Zn-PP Applikation auf den Blutdruckverlauf im Mausmodell für Präeklampsie .....	91
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>93</b>
6.1 HO-1 und HO-2 werden am Tag 14 der Schwangerschaft in der Plazenta von Abortmäuse herunterreguliert.....	94
6.2 Erhöhte Th1/Th2 Ratio in der Dezidua von Mäusen mit spontanem Abort im Vergleich zu normal schwangeren Mäusen am Tag 14 der Schwangerschaft.....	97
6.3 In Abortmäusen kommt es in der Plazenta und der Dezidua zu einer verminderten Expression von iNOS und eNOS am Tag 14 der Schwangerschaft.....	98
6.4 Die Behandlung mit Co-PP reguliert HO-1 hoch und führt zu verminderten Abortraten .....	99
6.4.1 Der therapeutische Effekt von Co-PP scheint nicht durch eine Veränderung der Th1/Th2/Th3 Antwort induziert zu werden.....	102

6.4.2 Eine erhöhte HO-1 Expression nimmt keinen Einfluss auf CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Zellen.....	105
6.4.3 Die iNOS und eNOS Expression am Tag 14 der Schwangerschaft weist keine Interaktion mit dem HO-System auf.....	107
6.4.4 Die erhöhte Expression von HO-1 führt am Tag 14 der Schwangerschaft zu einer Verminderten Apoptose und zu einem Anstieg der Expression anti- apoptotischer Moleküle.....	108
6.5 Zusammenfassung der HO-1 Daten beim spontanen Abort.....	110
6.6 Das HO-System in einem Mausmodell für Präeklampsie.....	111
6.6.1 Der Transfer von aktivierten Th1-Zellen führte zu Präeklampsie ähnlichen Symptomen.....	111
6.6.2 Die Hämoxygenase scheint bei den Präeklampsie-ähnlichen Symptomen im Mausmodell keine Rolle zu spielen .....	112
6.6.3 In Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen kommt es in der Dezidua zu einer erhöhten Produktion von Th1-Zytokinen.....	114
6.7 Zusammenfassung der HO-1 Daten beim murinen Modell für Präeklampsie.....	115
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
7.1 Abstract.....	117
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>143</b>
<b>10. Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>144</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO	Kohlenstoffmonooxid
Co-PP	Cobalt-Protoporpherin
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribobukleotidtriphosphat
DDT	1,4-Dithio-DL-Threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HBSS	<i>Hank's Balance Salt Solution</i>
HEPES	<i>4-2-Hydroxyethylpiperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HO	Hämoxygenase
HRP	Avidin-Biotin Peroxidase Komplex
IDO	Indol-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
i.p.	Intraperitoneal
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
M	Molar
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mmHG	1 Torr (Millimeter Quecksilbersäule)
MLLV-RT	Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase



mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffoxid
NOS	Stickstoffoxid-Synthase
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
NS	normale Schwangerschaft
NTC	<i>no template control</i>
ÜN	über Nacht
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
odT	oligo-dThymidin-Ribonukleotide
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Präeklampsie
PMA	Phorbol-12,13-myristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>rotation per minute</i>
RPMI	Synthetisches Zellkulturmedium (,Roswell Park Memorial Institute')
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SDS-PAGE	Natirumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	T-regulatorische Zellen

---

TUNEL	<i>Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>
UV	Ultravioletes Licht
Zn-PP	Zink-Protoporpherin

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Schwangerschaft

Die Schwangerschaft ist der Zeitraum, in dem eine befruchtete Eizelle im Körper der Frau zu einem Kind heranwächst. Die Schwangerschaft dauert beim Menschen von der Befruchtung der Eizelle bis zur Geburt des Kindes durchschnittlich 267 Tage und wird in drei Abschnitte zu je drei Monaten aufgeteilt (Moore und Persaud 1996).

Zu Beginn einer Schwangerschaft kommt es nach dem Eindringen (Imprägnation) des Spermiums in die Eizelle zur Reifeteilung. Aus beiden haploiden Chromosomensätzen formiert sich der männliche und der weibliche Vorkern, welche dann zu einer Zygote verschmelzen. Nach der Konjugation des Spermiums und der Eizelle wandert die Zygote mit Hilfe des Flimmerepithels des Eileiters und durch peristaltische Kontraktionen innerhalb der nächsten 4-5 Tage in die Gebärmutterhöhle ein (Moore und Persaud 1996).

Innerhalb der ersten 3-4 Tagen wird durch die Zellteilung das 16. Zellstadium (Morula) erreicht. Ab 32-64 Zellen kommt es zur Differenzierung der Morula in eine Blastozyste. Im Inneren dieser Blastozyste bildet sich ein Hohlraum. An der Innenwand dieses Hohlraumes lagert sich an einer Stelle ein Zellhaufen an, wobei die äußeren Zellen als Trophoblasten bezeichnet werden und die Zellen innerhalb des Zellhaufens als Embryoblasten. Die

Trophoblasten beginnen durch Flüssigkeitsabgabe den Hohlraum zu erweitern. Um den 5. bis 6. Tag nach der Befruchtung kommt es kurz vor der Implantation der Blastozyste zum Abstreifen der Zona pellucida, welche bis zu diesem Zeitpunkt die Blastozyste umschlossen hatte. Am 6. Tag erfolgt die Nidation, die Implantation der Blastozyste in die

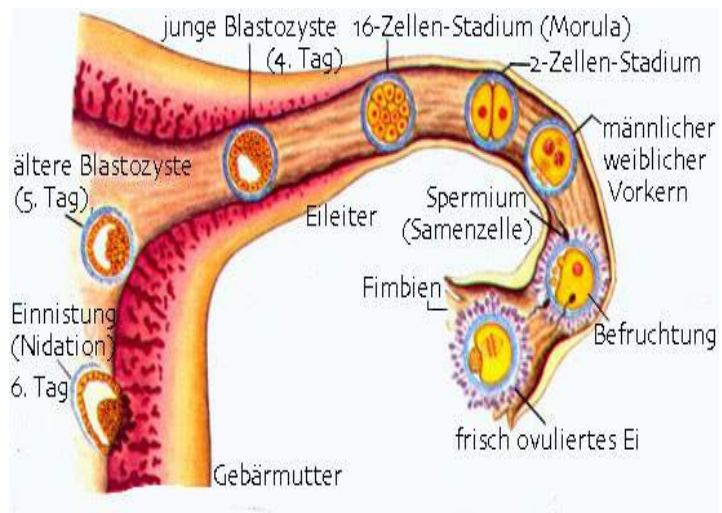


Abbildung 1: Schematische Darstellung von der Befruchtung der Eizelle bis zur Implantation in die Gebärmutter (Quelle: Qualimedica AG)

Gebärmutterwand. Die freie Blastozyste lagert sich hierzu an einer Stelle des Endometriums an. An dieser Stelle verschmelzen die Zellen der Trophoblasten mit der Schleimhautoberfläche zu dem Synziotrophoblasten. Das Zellgeflecht der Synziotrophoblasten bildet Pseudopodien aus, die in die Interzellularspalten zwischen den

Endometriumzellen eindringen. Die Embryoblasten wandern an der Innenseite der Trophoblastenhöhle bis zu der Stelle, an der die Anheftung stattgefunden hat, um dann in die Gebärmutterschleimhaut einzudringen. Anschließend folgt die Implantation des Embryoblasten. Durch die Implantation der Blastozyste in die Gebärmutterschleimhaut kommt es im Endometrium zur Umwandlung von Bindegewebszellen in Deziduaellen. Dieser Vorgang ist Progesteron abhängig und wird als Dezidualisierung bezeichnet. Nach der Implantation differenzieren sich die Trophoblasten in zwei Anteile, dem inneren Anteil (Zytotrophoblast), der dem Uteruslumen zugewandt ist, und der äußeren Schicht (Synzytiotrophoblast), die aktiv weiter in die Gebärmutter eindringt. Im Laufe der Schwangerschaft bildet sich aus den Trophoblasten und aus der mütterlichen Gebärmutterschleimhaut die Plazenta (Moore und Persaud 1996).

In der dritten Schwangerschaftswoche kommt es zur Gastrulation. Es bildet sich aus der zweischichtigen Keimscheibe eine dreikeimblättrige Anlage, weiterhin kommt es zur Ausbildung der ersten Blutgefäße am Dottersack, im Chorion und an der Allantois. Am Ende der dritten Woche kommt es dann zur Bildung der Herzanlage des Kindes und zur Zottenbildung. In der Embryonalphase zwischen der vierten und achten Woche bilden sich die Anlagen aller Organsysteme aus und es kommt zur wesentlichen Ausgestaltung der äußeren Körperform des Embryos. Am Ende dieser Phase sind alle wichtigen Organe angelegt, die meisten davon jedoch nicht funktionsfähig. In der Fetalperiode, welche von der neunten Woche bis zur Geburt andauert, kommt es zur Entwicklung vom Embryo zum Fetus. In dieser Phase findet hauptsächlich die Ausreifung und das Wachstum derjenigen Gewebe und Organe statt, welche in der Embryonalphase angelegt worden sind. (Moore und Persaud 1996).

Im Vergleich zu dem oben beschriebenen Prozess der Schwangerschaft im Menschen ist der Verlauf der Schwangerschaft bei einer Maus recht kurz und verläuft innerhalb von 20 Tagen.

## **2.2 Aufbau und Funktion der Plazenta**

Die Plazenta stellt eine Art passive Filtermembran dar, die mütterliches und fetales Blut voneinander trennt, aber dennoch einen gegenseitigen physiologischen Austausch ermöglicht (Moore und Persaud 1996).

Die im Laufe der Schwangerschaft entstehende Plazenta weist zwischen den verschiedenen Spezies zum Teil große Unterschiede auf. Diese einzelnen Plazentatypen werden durch die Anzahl der Gewebsschichten der materno-embryofetalen Barriere unterschieden (Tab. I). Bei Plazenten des hämochozialen Typs erfolgt nochmals eine Unterteilung durch die Anzahl der

Trophoblastenepithelschichten (Enders 1965, Benirschke und Kaufmann 2001). Die Plazenten der Maus und des Menschen zählen zum sogenannten hämochorialen Typ.

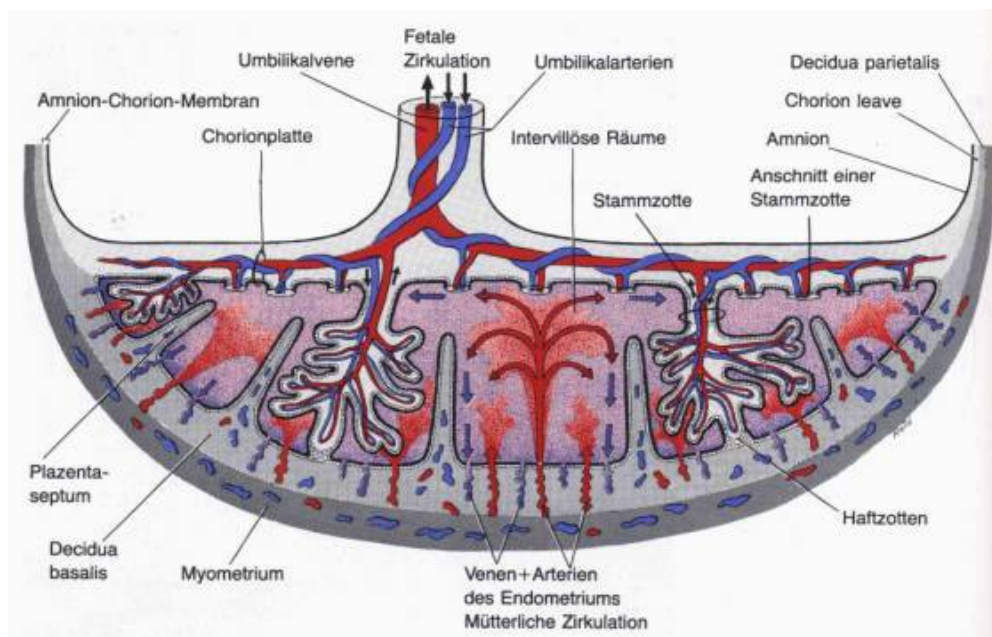
Plazentatyp	Zellschichten	Spezies	
Epitheliochorial	Endothel, Bindegewebe, Uterusepithel, Chorionepithel, Bindegewebe des Fetus, Endothel des Fetus	Schwein, Pferd	
Syndesmochorial	Endothel, Bindegewebe, Chorionepithel, Bindegewebe, Endothel	Schaf	
Endotheliochorial	Endothel der mütterlichen Gefäße ans Chorionepithel, Bindegewebe, Endothel	Hund, Elefant	
Hämochorial	das Blut reich direkt ans Chorionepithel, Bindegewebe, Endothel		
Subtypen des hämochorialen Typs			
	Hämomonochorial	Eine Schicht aus Syncytiotrophoblasten	höhere Primaten, Mensch
	Hämodichiral	Eine Schicht Syncytio- trophoblasten und eine Schicht Cytotrophoblasten	Biber
	Hämotrichorial	2 Schichten Syncytio- trophoblasten und eine Schicht Cytotrophoblasten	Ratte, Maus

Tabelle I: Plazentatypen der einzelnen Spezies mit Angabe über die Anzahl der Zellschichten die Mutter und Fetus voneinander trennen (Becker, Schiebler und Kubli 1981).

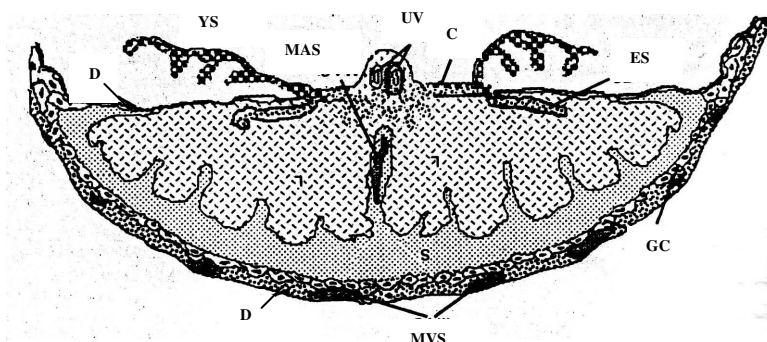
Die humane Plazenta weist zwischen der fetal Seite der Plazenta, also der Chorionplatte, der Nabelschnur und der mütterlichen Dezidua, einen mit mütterlichem Blut gefüllten intervillösen Raum (Lakune) auf. Dieser wird durch bindegewebige Plazentasepten von der Basalplatte aus in 15 bis 20 Felder, die sogenannten Kotyledonen, unterteilt. Aus der

Chorionplatte kommend, bilden sich Zottenbäume, bestehend aus Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten, die in den blutgefüllten Raum hineinragen. In den Tertiärzotten findet man Kapillarschlingen. Zwischen den Kapillaren der Tertiärzotten und dem intervillösen Raum findet aufgrund der Plazentaschranke kein Blutaustausch statt. Der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind erfolgt über Diffusion, Pinozytose oder wird über Rezeptoren vermittelt (Moore und Persaud 1996) (Abb 2A).

A)



B)



- |     |                                  |
|-----|----------------------------------|
| C   | Chorionplatte                    |
| L   | Labyrinth                        |
| S   | Verbindungszone („spongium“)     |
| GC  | Riesenzellen („giant cells“)     |
| D   | Dezidua                          |
| ES  | endodermaler Sinus               |
| MAS | maternal arterieller Sinus       |
| MVS | maternal venöser Sinus           |
| UV  | Umbilikalvene („umbilical vein“) |
| YS  | Dottersack („yolk sac“)          |
| RM  | Reichert's Membran               |

Abbildung 2: Schematische Darstellung einer A) humanen Plazenta (aus Moore und Persaud 1996) und B) murinen Plazenta (aus Zuckermann und Head 1986)

Die murine Plazenta wird in 4 Regionen aufgeteilt. Die einzelnen Regionen von innen nach außen betrachtet sind: 1. Die fetale Seite der Plazenta, also die Chorionplatte mit der Nabelschnur. 2. Das Labyrinthgewebe, welches die sogenannte Plazentaschranke enthält und

somit die Grenze zwischen maternalen und embryonalen Blut darstellt. 3. Die Verbindungszone (Trophospongium), welche aus Spongio- und glykogenreichen Trophoblasten besteht. 4. Die Zone der Riesenzellen (Müntener und Hsu 1977, Zuckermann und Head 1986) (Abb. 2B).

Der Aufbau der Plazenta dieser zwei Spezies weist wesentliche Unterschiede auf, wobei die Organisation der Zotten eine der Möglichkeiten zur Unterscheidung der Struktur der menschlichen Plazenta darstellt (Wooding und Flint 1994). Menschliche Plazenten haben mehrere Keimblätter, die in Klustern angeordnet sind. Plazenten der Mäuse hingegen haben ein einziges Keimblatt. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Organisation der Trophoblasten. Sowohl beim Menschen als auch bei den Mäusen kommt es durch Lücken im Endometrium zu einem direkten Kontakt des mütterlichen Blutes mit den Trophoblasten. Die Trophoblasten-Zellschicht bei Mäusen besteht aus 3 Schichten, und zwar 2 syncytiale Zellschichten und eine mononukleare Zellschicht. Menschen hingegen weisen zusätzlich zu der Trophoblasten-Stammzellschicht nur eine einfache syncytiale Zellschicht auf. Die invasiven Trophoblasten bei Mäusen und Menschen dienen als weiteres Unterscheidungsmerkmal. Die Riesenzellen der Mäuse sind streng mit der mütterlichen Spiralarterie verbunden, welche die Implantationen mit Blut versorgt (Adamson *et al.* 2002). Die Glykogentrophoblasten beim Menschen hingegen zeigen keine besondere Assoziation mit der Spiralarterie und wandern in den Zwischenraum der mütterlichen Dezidua (Adamson *et al.* 2002).

### **2.3 Hypothesen zur Akzeptanz des Fetus**

Eine erfolgreiche Schwangerschaft und die Geburt eines gesunden Kindes hängen von einer Vielzahl verschiedener Mechanismen ab. Die Mechanismen, die das Überleben des fremden Feten im mütterlichen Uterus trotz einer ständigen aggressiven Überwachung des mütterlichen Immunsystems gewährleisten, sind bis heute kaum bekannt. Jedoch gibt es verschiedene Hypothesen wie der Fetus überlebt.

Der Fetus wird heute allgemein als ein intrauterines Allotransplantat angesehen. Dieses Konzept stammt von Medawar (1953), auch wenn dies nicht explizit in seiner Arbeit erwähnt wird. Er postulierte drei mögliche Theorien, um diese Hypothese zu belegen.

Zum einen postulierte er, dass der Fetus und die Mutter separate Blutkreisläufe aufweisen, was eine anatomische Trennung zwischen Mutter und Fetus bedeuten würde. Als zweite Theorie, warum der Fetus von der Mutter akzeptiert wird, nannte er die Unreife der

Antigenität des Fetus, und als dritte Theorie die maternale immunologische Starre. Alle drei Hypothesen konnten jedoch im Laufe der Zeit widerlegt werden. So konnte gezeigt werden, dass es keine anatomische Grenze zwischen dem Fetus und der Mutter gibt und dass fetale Zellen, z.B. Trophoblasten, in der Lunge der Mutter, aber auch maternale Zellen im Kreislauf des Fetus, zu finden sind (Lo *et al.*, 1996, Bianchi *et al.*, 1994). Die Studien von Jones *et al.* (2002) belegten, dass die Anzahl an B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) die MHC Klasse II Moleküle exprimieren, zwischen Erwachsenen und Feten im letzten Schwangerschaftsdrittel gleich war. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die Anzahl an CD40<sup>+</sup>- und CD86<sup>+</sup>-Monozyten zwischen Feten des 3. Trimenons und dem Erwachsenenstadium vergleichbar war, was gegen eine Unreife der Antigenität des Fetus spricht. Tafuri und Mitarbeiter (1995) beschrieben, dass alloreaktive Zellen systemisch in der Mutter nachweisbar sind und dass es an der feto-maternalen Grenze zu einer aktiven Regulation der alloreaktiven Immunantworten der Mutter kommt. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass es in der Schwangerschaft nicht zu einer maternalen immunologischen Starre kommt.

Zwei weitere allgemeine Hypothesen, wie es zu einer allgemeinen Akzeptanz der Feten kommen könnte, wurden zum einen von Chaouat und Mitarbeiter (1983) und Wegmann (1988) und zum anderen von Clark und Mitarbeiter (1999) postuliert.

Chaouat und Wegmann verglichen Trophoblastenzellen mit Tumorzellen. Tumorzellen werden vom Immunsystem nicht als schädigend erkannt und können somit ungehemmt wachsen, auf ähnliche Art sollte daher auch der Fetus nicht erkannt werden. Diese Hypothese wurde aufgrund der Tatsache, dass ein Austausch von Lymphozyten zwischen Mutter und Fetus erfolgt (Piotrowski und Croy 1996), wieder verworfen.

Die Tatsache, dass der Embryo Nährstoffe und andere Bestandteile, die er zum Wachstum benötigt, von der Mutter erhält, veranlasste Clark, den Fetus mit einem Parasiten zu vergleichen (Clark *et al.* 1999). Ein Parasit entzieht seinem Wirt alle benötigten Nährstoffe, wodurch es zu einer Schwächung und Schädigung des Wirtes, beim Raubparasitismus sogar zum Tod des Wirtes kommt (Lucius und Loos-Frank 1997). Im Vergleich dazu wird die Mutter normalerweise nicht durch den Fetus geschädigt. Kommt es im Laufe der Schwangerschaft zu Komplikationen wird eher der Fetus abgestoßen, bevor es zu einer Schädigung des mütterlichen Organismus kommt. Ein weiterer Unterschied zwischen Fetus und Parasit ist, dass das Immunsystem der Mutter den Fetus als selbst anerkennt und aktive Toleranzmechanismen hervorruft, den Parasiten jedoch als nicht selbst, was gegen die Hypothese von Clark und Mitarbeiter (1999) spricht.



Kommt es zu einem Defekt, der die natürliche Akzeptanz an der feto-maternalen Grenze herabsetzt, könnte dies eine Abstoßung des Feten durch das mütterliche Immunsystem zur Folge haben.

Die zellularen und molekularen Mechanismen, die zu einer Akzeptanz oder einer Abstoßung eines Fetus führen, wurden intensiv untersucht. Es wurden verschiedene Moleküle identifiziert, welche bei diesen Mechanismen eine besondere Rolle spielen könnten:

Indol-2,3-Dioxygenase (IDO), welches die essentielle Aminosäure Tryptophan katabolisiert, ist eines der Enzyme, was bei der Akzeptanz der Feten eine Rolle zu spielen scheint, da aktivierte T-Zellen besonders stark durch die Mengen an Tryptophan beeinflusst werden. Diese regulatorische Wirkung von IDO findet man aber auch bei Transplantaten oder Autoimmunität (Munn *et al.* 1998, Fallarino *et al.* 2003). Man konnte kurz nach der Implantation eine stark erhöhte Menge von IDO in Zellen der feto-maternalen Grenze beobachten, wodurch es zu einer Nährstoffverarmung kommt, welche in einer verringerten maternalen T-Zellaktivität resultiert (Munn *et al.* 1998, Mellor und Munn 2001). Durch die Hemmung von IDO mittels 1-Methyltryptophan kommt es durch die erhöhte T-Zellaktivität zu einer schnellen Abstoßung allogener Feten. Die Effekte, die durch den IDO Inhibitor 1-Methyltryptophan ausgelöst wurden, waren pharmakologischen Ursprungs (Mellor und Munn 2001). Baban und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass eine allogene Verpaarung von IDO-defizienter Mäuse zu einer normalen Schwangerschaft führt, was deutlich zeigt, dass in diesen Mäusen noch andere immunsuppressive Mechanismen im Laufe der Schwangerschaft auftreten müssen, und dass IDO bei der Akzeptanz des Fetus keine Rolle spielt.

An der feto-maternalen Grenze kommt es in fetalen Zellen zur Expression des nichtklassischen Klasse I Gens HLA-G (Le Bouteiller 1994). HLA-G scheint in der Lage zu sein, eine lokale Toleranz zu induzieren und könnte für die Immunmodulation der mütterlichen T-Zell-Population im Uterus mit verantwortlich sein (Ober *et al.* 1998), indem es die Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zellen supprimiert (Bainbridge *et al.* 2000).

Treg-Zellen scheinen bei der Akzeptanz der Feten ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Im peripheren Blut und in der Dezidua von Frauen mit einer normalen Frühschwangerschaft konnten erhöhte Mengen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, wenn man sie mit nichtschwangeren Frauen oder Frauen mit einem Spontanabort verglich (Sasaki *et al.* 2004). Weiterhin wurden erhöhte Mengen von Foxp3 und CTLA-4 beobachtet, was ein Hinweis dafür ist, dass es sich bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen um Treg-Zellen und nicht um aktivierte Zellen handelt (Sasaki *et al.* 2004, Somerset *et al.* 2004).

Aluvihare und Mitarbeiter (2004) konnten nachweisen, dass in schwangeren C57BL/6 – Mäusen die Anzahl an Treg-Zellen, im Vergleich zu nicht-schwangeren Weibchen, erhöht war, unabhängig von der Syn- oder Allogrenität des Fetus. Ein Transfer von gepoolten Lymphozyten aus normal-schwangeren BALB/c Mäusen in BALB/c nu/nu-Weibchen, welche anschließend mit C57BL/6 Männchen verpaart wurden, führte zu einer normalen Schwangerschaft. Nach dem Transfer von gepoolten Lymphozyten, bei denen eine Depletion CD25<sup>+</sup>er T-Zellen erfolgt war, konnte man in den C57BL/6 verpaarten BALB/c nu/nu-Weibchen zahlreiche Resorptionen beobachten. Aluvihare und Mitarbeiter (2004) belegten somit, dass die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem Fetus unter anderem durch Treg-Zellen vermittelt wird.

Zenclussen und Mitarbeiter (2006) bewiesen, dass im Thymus von CBA/J Weibchen, welche mit DBA/2J Männchen verpaart wurden, die Anzahl von T-regulatorischen Zellen (Treg) signifikant reduziert war, im Vergleich zu schwangeren CBA/J der Verpaarungskombination CBA/J x BALB/c. Weiterhin war man in der Lage, durch einen Transfer von Treg-Zellen aus schwangeren DBA/2J verpaarten CBA/J Weibchen die Abortrate in den Tieren zu senken. Zenclussen und Mitarbeiter (2006) postulierten, dass die Treg-Zellen durch Alloantigene stimuliert werden müssen, um den Fetus vor einem Abort zu schützen, da ein Transfer von Treg-Zellen aus nicht-schwangeren CBA/J Mäusen die Abortrate nicht reduzierte.

Auf die Rolle von Th1/Th2-Zytokinen bei der Akzeptanz der Feten wird in 2.8.2 genauer eingegangen.

Ein weiteres Molekül, welches einen Einfluss auf die Schwangerschaft nehmen könnte, ist die Hämoxygenase (HO). In der Transplantationsimmunologie konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen an HO-1 zu Abstoßungen von Transplantaten führen. Tullius *et al.* zeigten, dass man durch eine erhöhte Expression von HO-1 die Akzeptanz eines Transplantates stark erhöhen konnte. HO-1 scheint die inflammatorischen Reaktionen, die nach einer Transplantation auftreten, stark zu reduzieren (Soares *et al.* 1998, Pileggi *et al.* 2001). Da der Fetus als Allotransplantat angesehen werden kann, sollte HO-1 auch bei Schwangerschaften eine wichtige Rolle spielen. Auf die genaue Rolle von HO-1 bei der Schwangerschaft wird in 2.7.4 genauer eingegangen.

## 2.4 Abort

Nicht immer kommt es jedoch zu einer erfolgreichen Schwangerschaft. Verschiedene Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. Präeklampsie und spontane Fehlgeburten, können sowohl zum Tod des Fetus als auch in manchen Fällen zum Tod der Mutter führen.

Bei einer spontanen Fehlgeburt handelt es sich um die vorzeitige, nicht beabsichtigte Beendigung der Schwangerschaft durch Abstoßung eines Fetus vor Erreichen der Überlebensfähigkeit mit einem Gewicht von weniger als 1000g (Pschyrembel 2004).

Man unterscheidet verschiedene Formen des Frühabortes. Beim *Abortus imminens* oder drohenden Abort kommt es zu leichten Blutungen, beim *Abortus incipiens* oder einsetzendem Abort kommt es zu überperiodisch starken Blutungen und die Schwangerschaft ist bereits beendet, beim unvollständigem Abort (*Abortus incompletus*) kommt es zu starken Blutungen mit Gewebeabgang und die Frucht oder Anteile davon wurden bereits von der Gebärmutter ausgestoßen, beim *Abortus completus* hat der Uterus die Frucht bereits vollständig ausgestoßen und beim verhaltenen Abort (missed abortion) hat sich der Fetus nicht weiterentwickelt und wurde ausgestoßen (Benirschke und Kaufmann 2001, Pschyrembel 2004, Stirrat 1990). Nach mindestens 3 spontanen Abgängen spricht man vom habituellen Abort und tritt bei ca. 5% aller schwangeren Frauen auf (Roman 1984, Knudsen *et al.* 1991), wobei das Risiko mit zunehmender Anzahl von Aborten immer größer wird.

15-25 % aller Schwangerschaften enden vorzeitig in einem spontanen Abort (Roth 1963 Coulam 1991). Diese Zahlen entsprechen aber nur Schwangerschaften, die man durch herkömmliche Methoden, wie Ultraschall oder Bestimmung des Schwangerschaftshormons hCG, festgestellt hat. Man nimmt jedoch an, dass die eigentliche Anzahl der Aborte sehr viel höher liegt, da viele der Feten vor dem Zeitpunkt der nächsten Regelblutung abgestoßen werden und so nicht erkannt werden. Edmonds und Mitarbeiter (1982) und Whittaker und Mitarbeiter (1983) haben durch Kombination von frühen und späten Aborten eine tatsächliche Abortrate von 20-62% postuliert.

Coulam (1991) beschrieb, dass der größte Teil der habituellen Aborte durch eine unpassende oder falsche Immunantwort hervorgerufen wird, der geringste Teil durch infektiologische und genetische Ursachen. Bei einmaligen Fehlgeburten hingegen werden chromosomale Anomalien mit ca. 50% als Hauptgrund des Aborts beschrieben (Boue *et al.* 1975, Stephenson 1996).

## 2.5 Präeklampsie

Eine weitere sehr ernste Schwangerschaftskomplikation ist die Präeklampsie, eine Form von schwangerschafts-bedingtem Bluthochdruck. Präeklampsie tritt ausschließlich ab der 20sten Schwangerschaftswoche, also im späten 2. bzw. 3. Schwangerschaftsdrittel, bei etwa 6-8% aller Schwangerschaften auf (Robillard 2002). Vorstadien der Präeklampsie sind zum einen eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und zum anderen eine isolierte Proteinurie. Treten jedoch beide Symptome gleichzeitig auf, spricht man von Präeklampsie (Goerke 2002). Die klinischen Merkmale einer Präeklampsie sind somit ein stark erhöhter Blutdruck und Proteinurie. Des Weiteren kann man bei vielen Patientinnen eine vermehrte Ödembildung und eine damit verbundene Gewichtszunahme beobachten (Robillard 2002).

Vorstadien der Präeklampsie, wie die Hypertonie, lassen sich durch medikamentöse Behandlung, z.B. durch Gabe von Beta-Blockern, behandeln. Da jedoch die Pathogenese der Präeklampsie nicht bekannt ist, bleibt die einzige mögliche Therapie hierbei die vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft, welche unabhängig von der SSW und dem Zustand des Kindes erfolgen sollte, da bei mehrmaligen Anfällen die Gefahr eines Multiorganversagens mit Todesfolge besteht.

Die Mechanismen, die zu einer Präeklampsie führen, sind bislang unbekannt, jedoch wird vermutet, dass es durch immunologische Fehlanpassungen zu einer unzureichenden Invasion der Trophoblasten in das Endometrium in der 14. Schwangerschaftswoche kommt (Robillard, 2002, Pijnenborg *et al.* 1996). Daraufhin kommt es zu einer unzureichenden Dilatation der Spiralarterien, was zum einen zu einer verminderten präplazentalen Durchblutung führt, andererseits zu einer akuten Gefäßatherose. Als Reaktion der Disfunktion der Endothelzellen und der daraus resultierenden Perfusionsstörung der Plazenta, versucht der Körper der Mutter diese Störung zu kompensieren. Die Kompensation erfolgt durch die Erhöhung des Blutdrucks, dies führt jedoch wiederum zu Endothelschäden in der Niere, und es kommt zur Proteinurie (Redman *et al.* 1999).

Bei schwangeren Frauen mit Präeklampsie konnte man erhöhte Mengen an mütterlichen Entzündungszellen, wie Granulozyten und Monozyten beobachten (Sacks *et al.* 1997, Oian *et al.* 1985, Greer *et al.* 1989). Zusätzlich wurden erhöhte Mengen von entzündungsfördernden Th1 Zytokinen beschrieben (Stark 1993, Saito *et al.* 1999, Darmochwal-Kolarz *et al.* 1999). Zenclussen und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass die Behandlung von C57BL/6-schwangeren BALB/c Mäusen mit aktivierten Th1-Zellen Präeklampsie-ähnlichen Symptomen in diesen Mäusen auslöst.

## 2.6 Mausmodelle für spontanen Abort und Präeklampsie

### 2.6.1 Mausstämme

Der DBA Mausstamm ist der älteste Inzuchtstamm und wurde 1909 von Dr. CC Little eingeführt. Der DBA/2J Mausstamm beinhaltet eine genetische Veränderung des ursprünglichen DBA Stammes und erhielt die Bezeichnung durch den Züchter, die Jackson Laboratory (Staats 1966).

Der CBA Mausstamm wurde 1920 von Strong erstmalig herangezüchtet, wobei er Bagg Albino Weibchen mit einem DBA Männchen verpaarte. Über Andervont gelang der CBA Mausstamm 1948 zu den Jackson Laboratory (Green und Witham 1991).

Der BALB/c Mausstamm wurde von MacDowell 1923 aus einer Inzucht von Bagg Albino Mäusen (BALB) gezüchtet. 1935 fügte Dr. Snell der Bezeichnung BALB das "c" hinzu, da der Genotype des „Farb“ locus *c/c* ist (Potter 1985).

Der C57BL Mausstamm wurde 1921 von Little herangezüchtet. Der C57BL/6 Mausstamm stammt aus einer Inzucht mit mindestens 20 Generationen von Bruder-Schwester-Verpaarungen, wobei die beiden Mauslinien C57BL/6 und C57BL/10 vor 1937 voneinander getrennt gezüchtet wurden (Green und Witham 1991).

### 2.6.2 Das Mausmodell für spontanen Abort CBA/J x DBA/2J

Das von uns verwendete murine Modell für eine spontane Fehlgeburt im ersten Trimester der Schwangerschaft wurde erstmals von Clark und Mitarbeiter (1980) beschrieben. Bei der Verpaarung weiblicher CBA/J-Mäuse mit männlichen DBA/2J-Mäusen kommt es zu einer spontanen Abortrate von 20-50% (abhängig von der Tierhaltung). Bei einer Kombination von weiblichen CBA/J Mäusen mit männlichen BALB/c Mäusen kommt es zu einer normalen Schwangerschaft ohne Aborte.

Die erhöhte Abortrate in der Verpaarungskombination CBA/J x DBA/2J kann nicht auf einen Unterschied in den Haupthistokompatibilitätskomplexen zurückzuführen sein, da der murine Histokompatibilitätskomplex, der dem humanen Haupthistokompatibilitätskomplex MHC Klasse I entspricht, sowohl bei dem Mausstamm DBA/2J als auch bei BALB/c Mäusen H-2d ist. Der CBA/J Stamm weist den Histokompatibilitätskomplex H-2k auf (Staats 1976).

Die erhöhte Abortrate von CBA/J x DBA/2J im Vergleich zu CBA/J x BALB/c scheint vielmehr an Unterschieden in den Nebenhistokompatibilitätskomplexen (*minor histocompatibility complex*) bei DBA/2J und BALB/c zu liegen (Clark *et al.* 1980, Chaouat *et al.* 1988). Clark und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass bei BALB/c-Männchen ein P-

Gen expremiert wird, welches bei der Aktivierung von  $CD8^+$  T –Zellen eine Rolle spielt. In den DBA/2J Mäusen jedoch konnte kein P-Gen nachgewiesen werden.

Die erhöhten Abortraten könnten aber ebenso auf andere Ursachen zurückgeführt werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass in DBA/2J Männchen sehr viel weniger HO-1 expremiert wird als in den BALB/c Männchen (Wollenberg *et al.* in Vorbereitung). Weiterhin konnte Zenclussen und Mitarbeiter (2005) nachweisen, dass in den schwangeren CBA/J Mäusen, welche mit DBA/2J Männchen verpaart wurden, signifikant weniger Treg-Zellen aufzuweisen sind. In der Plazenta von CBA/J Mäusen, welche mit männlichen DBA/2J Mäusen verpaart wurden, wurden geringere Mengen der Th2-Typ Zytokine IL-4 und IL10 beobachtet als bei der Verpaarungskombination CBA/J x BALB/c (Chaouat *et al.* 1995). Diese Beobachtungen könnten sich auch auf die Anzahl der Aborte auswirken.

### **2.6.3 Das Mausmodell für Präeklampsie**

Das Mausmodell für Präeklampsie wurde von Zenclussen und Mitarbeiter (2004) entwickelt. Bei dem Modell werden weibliche BALB/c Mäuse mit männlichen C57BL/6 Mäusen verpaart. Die Kombination dieser beiden Mausstämme führt zu einer normalen Schwangerschaft. Zur Simulation von Präeklampsie-ähnlichen Symptomen werden den trächtigen BALB/c Mäusen am Tag 10 und 12 der Mausschwangerschaft aktivierte Th1-Lymphozyten i.v. injiziert. Um physiologische Veränderungen im Laufe der Schwangerschaft beobachten zu können, wird bei den Mäusen vom Tag 0 bis zum Tag 14 Schwangerschaft der Blutdruck gemessen. Die Messung erfolgt alle zwei Tage.

Die Autoren postulierten, dass durch die transferierten Th1-Zellen vermehrt Th1-Zytokine produziert werden, wodurch die mauseigenen Th-Zellen sich vermehrt zu Th1-Zellen entwickeln und es zur Expression von entzündungsfördernden Th1-Zytokinen kommt, was Beobachtungen bei Frauen mit Präeklampsie entspricht (Stark 1993, Saito *et al.* 1999 Pijinenborg *et al.* 1996). Nach der Behandlung mit aktivierten Th1-Zellen kommt es in den Mäusen zur Ausbildung von Präeklampsie-ähnlichen Symptomen: erhöhter Blutdruck, Proteinurie und Schädigung der Niere. Die Ausbildung der Präeklampsie-ähnlichen Symptome ist bei diesem Modell ausschließlich auf schwangere Mäuse beschränkt. In nicht schwangeren Mäusen, die mit aktivierten Th1-Zellen behandelt wurden, kommt es zu keinen klinischen Veränderungen. Auch der Transfer von aktivierten Th2-Zellen in schwangere Mäuse führt zu keinen physiologischen Veränderungen (Zenclussen *et al.* 2004).

Die Kontrollgruppe bekommt am Tag 10 und 12 der Mausschwangerschaft eine neutrale Pufferlösung, was zu keiner physiologischen Veränderung führt.

## 2.7 Die Hämoxygenase

Das Hämoxygenase-Enzym ist für den Abbau des freien Häm verantwortlich, wobei der Hämoglobinabbau aus Erythrozyten, der hauptsächlich in Milz und Leber stattfindet, wohl die wichtigste Rolle spielt. Die chemische Grundlage, um molekularen Sauerstoff zu binden und zu transportieren, sind die Metalloporphyrine, die aus einer Verbindung eines Porphyrinringes mit einem katalytisch aktiven Metallion bestehen. Das Ferro-(Fe<sup>2+</sup>)-protoporphyrin IX oder auch als Häm bezeichnet, ist eines dieser Metalloporphyrine. Das Häm kommt fast ausschließlich in Verbindung mit Proteinen vor und dient dort als deren prosthetische Gruppe (Maines *et al.* 1992).

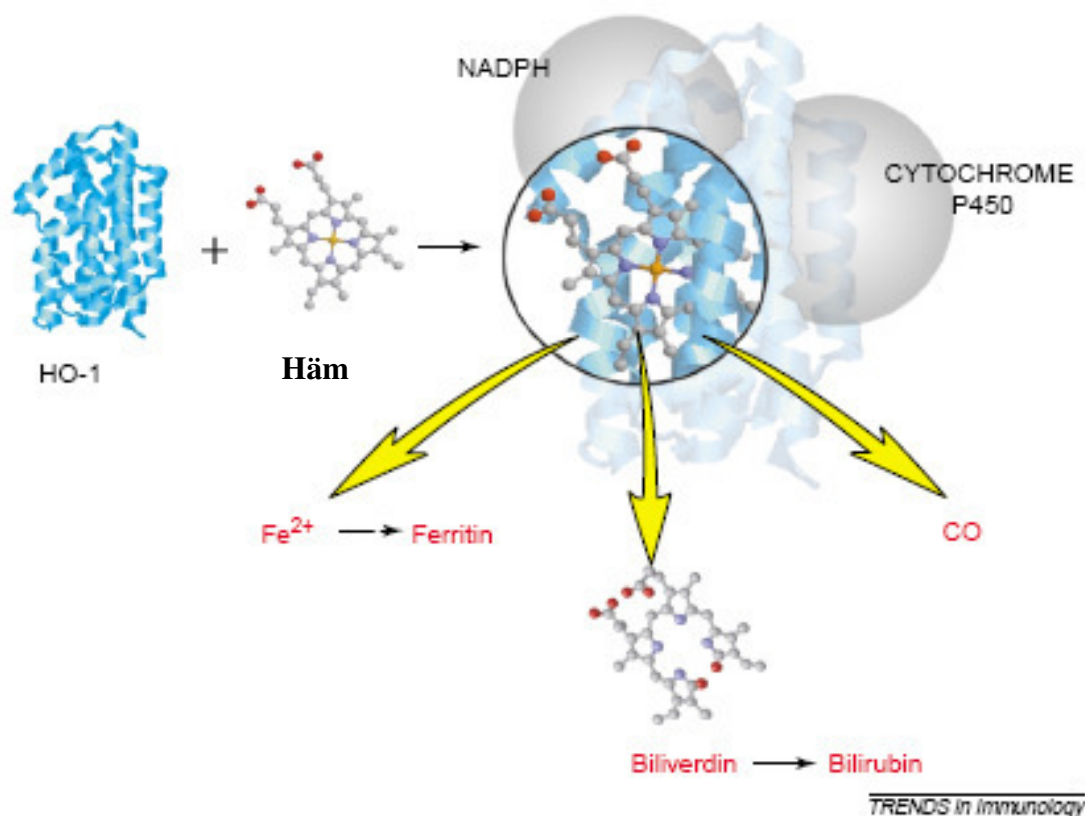


Abbildung 3. Abbau von Häm in Biliverdin (aus Otterbein *et al.* 2003)

Die verschiedenen Hämproteine weisen die unterschiedlichsten Funktionen auf. Die zwei Bekanntesten (Hämoglobin und Myoglobin) sind am Sauerstofftransport beteiligt, da sie als Sauerstoffspeicher fungieren. Andere Hämproteine, wie Cytochrom P<sub>450</sub> und Cytochrom Oxidase, dienen der Sauerstoff-Aktivierung und Cytochrome (c, c<sub>3</sub>, b, a, a<sub>3</sub>) dem

Elektronentransport. Der Aufbau des Häms aus Aminolävulinsäure erfolgt unter Beteiligung mitochondrialer Enzyme (Maines *et al.* 1992). Genauso wichtig wie die Neubildung des Häms ist der Abbau des aus den Hämproteinen freigesetzten Häms. Das Häm wird in einer Reihe von mitochondrialer und zytosolischer Enzymreaktionen zu Gallenfarbstoffen abgebaut, wobei die Hämoxygenase als erstes Enzym hierbei eine besondere Rolle spielt (Kikuchi & Yoshida 1983, Maines *et al.* 1988).

### 2.7.1 Formen der Hämoxygenase

Es wurden bisher drei verschiedene Formen der Hämoxygenase beschrieben: die induzierbare Form HO-1 und die zwei konstitutiven Formen HO-2 und HO-3.

Das Gen für HO-1 (Shibahara *et al.* 1987) und das Gen für HO-2 (McCoubrey & Maines, 1994, McCoubrey *et al.* 1995) befinden sich auf unterschiedlichen Chromosomen, haben aber beide eine ähnliche Struktur (5 Exons und 4 Introns), das HO-2 Gen ist durch ein sehr langes Intron 1 aber fast doppelt so groß wie das HO-1 Gen. Die Promotorregionen beider Gene weisen dagegen grössere Unterschiede auf. Die Promotorregion des HO-1 Gens besitzt mehrere regulatorisch wirksame Domänen (Lavrovsky *et al.* 1994), im Gegensatz zum HO-2 Gen, welches nur während der Entwicklung bedeutsames *Glucocorticoid response-element* (GRE) aufweist.

Bei HO-1 handelt es sich hauptsächlich um ein Enzym, welches auf Stress reagiert und durch eine Vielzahl von Stress-Faktoren, wie oxidativen Stress, inflammatorische Zytokine, Hitze, Schock, Schwermetalle und ultraviolette Strahlung, aktiviert werden kann (Terry *et al.* 1999, Keyse *et al.* 1989, Applegate *et al.* 1991, Maines *et al.* 1993). HO-2 wurde hingegen als nicht induzierbar eingestuft (Montellano 2000), es konnte jedoch gezeigt werden, dass HO-2 in bestimmten Geweben, wie der Deizidua und der Plazenta, induzierbar ist (Lindquist *et al.* 1988, Zenclussen *et al.* 2002)

Über HO-3 ist noch wenig bekannt. Man vermutet, dass es eine regulatorische Funktion in Häm-abhängigen zellularen Prozessen haben könnte (McCoubrey *et al.* 1997).

### 2.7.2 Funktion der Hämoxygenase

Bei dem Abbau des Häms kommt es durch die Bindung der Hämoxygenase an das Häm zu einer Abspaltung des zentralen Eisenatoms und einer Spaltung der Methinbrücke unter CO-Freisetzung. Anschließend werden zwei Sauerstoffatome zwischen den Pyrrolringen A und B



des Tetrapyrrolringes eingebaut. Das entstandene Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdinreduktase, ein zytosolisches Enzym, weiter zu Bilirubin reduziert und nach der Konjugation mit verschiedenen Zuckern über die Galle ausgeschieden (Maines 1992). Bilirubin wird als antioxidative Substanz einer großen physiologischen Bedeutung zugeschrieben (Stocker *et al.* 1987). Die Freisetzung von Kohlenstoffmonooxid (CO) scheint besonders bei der Entspannung von verschiedenen Blutgefäßen bei der Zell-Zell Kommunikation und bei der Akzeptanz von Transplantaten eine große Rolle zu spielen (Marks 1991, Sato *et al.* 2001, Vedernikov *et al.* 1989). Zu große Mengen an CO wirken hingegen toxisch, da CO im Vergleich zu O<sub>2</sub> eine größere Affinität zu Häm besitzt und es somit zu einer CO-Vergiftung kommen könnte.

Geringe Mengen an HO sind für das Gewebe schädlich, da es zu einer Ansammlung von großen Mengen freien Häms kommt (Mantovani *et al.* 1997), welches in der Lage ist, das Gewebe zu schädigen. Ungebundenes Häm ist *per se* giftig und kann aufgrund seiner hydrophobischen Komponenten sehr einfach durch Zellmembranen gelangen (Balla *et al.* 2003). Freies Häm ist aber auch in der Lage, indirekt die Integrität von Endothelzellen zu beeinflussen, da es oxidative Veränderungen des Lipoprotein LDL (low-density lipoprotein) vermitteln kann (Balla J *et al.* 2000, Balla *et al.* G 1991). Somit kann das ungebundene Häm zu Gewebsentzündungen und -schäden führen (Balla *et al.* 1991, 1993, 2003).

### 2.7.3 Die Rolle von HO bei Transplantaten

Erstmals wurde die schützende Funktion von HO-1 in der Transplantationsimmunologie beschrieben (Soares *et al.* 1998, Tullius *et al.* 2002). Soares und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass Herztransplantate, die aus einer HO-1<sup>-/-</sup> Maus stammten, in immunsupprimierten Mäusen im Vergleich zu einem Spenderherz aus HO-1<sup>+/+</sup> Mäusen relativ schnell abgestoßen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein einziges anti-inflammatorisch wirkendes Gen (HO-1), welches in Endothelzellen der Herztransplantaten exprimiert wurde, in der Lage war, das Transplantat vor einer Abstoßung zu schützen.

Eine Behandlung mit Cobalt-protoporphyrin (Co-PP), welches als HO-1 Induzierer beschrieben wurde, führte bei Lebertransplantationen zu einer verlängerten Akzeptanz des Transplantates und verhinderte eine frühe Ischämie (Kato *et al.* 2001, Redaelli *et al.* 2002). Tullius und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass eine Behandlung mit Co-PP zu einer erhöhten Expression der HO-1 in den transplantierten Mäusen führt. Die erhöhten Mengen an HO-1 ermöglichten eine Verminderung der frühen inflammatorischen Reaktion, welche

normalerweise nach der Transplantation auftritt und verhinderte somit die chronische Abstoßung der Transplantate. Eine Behandlung mit Sn-PP, ein Inhibitor der HO-1, führte zu einer frühen Abstoßung von Lebertransplantaten und war in der Lage, den positiven Effekt, den man durch die Behandlung mit Co-PP beobachten konnte, zu negieren (Redaelli *et al.* 2002).

Auch andere Studien zeigten, dass eine Überexpression von HO-1 die Organe bzw. das Gewebe vor immunvermittelten Schäden schützt. Man postulierte, dass HO-1 entweder die oxidativen Schäden verhindert oder einen Einfluss auf die lokale Immunantwort von inflammatorischen Zellen hat (Dong *et al.* 2000, Otterbein *et al.* 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von HO-1 zu einer verringerten Ischämie führt und die Lebenserwartung und Akzeptanz von Herz- und Lebertransplantaten stark verlängert (Woo *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Hancock *et al.* 1998, Cuturi *et al.* 1999, DeBruyne *et al.* 2000). Die Induktion von HO-1 verhinderte in diesen Transplantaten die Entwicklung von Arteriosklerose und man konnte beobachten, dass es zu keiner vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen kam (Hancock *et al.* 1998).

#### **2.7.4 Die Funktion von HO in Schwangerschaften**

Die Tatsache, dass HO-1 bei der Akzeptanz von Transplantaten eine große Rolle spielt (siehe 2.7.3), in Verbindung mit der Hypothese, dass der Fetus mit einem Allotransplantat vergleichbar ist (siehe 2.3), liegt es nahe, dass HO auch bei dem Verlauf von Schwangerschaften eine ähnliche Rolle spielen könnte.

Studien mit HO-1  $\text{ }^{-/-}$  Mäusen zeigten, dass diese Mäuse von Geburt an kleiner als HO-1  $\text{ }^{+/+}$  Mäuse sind. Weiterhin ist die Lebenserwartung der HO-1  $\text{ }^{-/-}$  verringert und ab der 25. Lebenswoche wurden die Tiere meist sehr dünn. Des Weiteren zeigte sich, dass es bei weiblichen HO-1  $\text{ }^{-/-}$  Mäusen zu keiner erfolgreichen Schwangerschaft kam (Poss and Tonegawa 1997a,b), welches auf eine gewebesetzende Funktion von HO im Laufe der Schwangerschaft hindeutet.

Acevedo und Mitarbeiter (1998) waren die ersten, die eine Expression von HO-1 und HO-2 im humanen Uterus beschrieben. Sie konnten weiterhin zeigen, dass die Expression von HO im Myometrium schwangerer Frauen um das 16fache erhöht war, im Vergleich zu nichtschwangeren Frauen.

Im Verlauf der Schwangerschaft scheint die Expression von HO-1 und HO-2 im Gewebe der plazentalen Zotten zu schwanken. So wurde eine fortlaufende, wenn auch schwache

Expression von HO-1 während der gesamten Schwangerschaft beobachtet; HO-2 scheint hingegen nur temporär exprimiert zu werden (Lyall *et al.* 2000). So war die Expression von HO-2 in Synzytiotrophoblasten zu Beginn der Schwangerschaft signifikant höher als am Ende der Schwangerschaft. Die Autoren postulierten daher, dass zu Beginn der Schwangerschaft größere Mengen an CO benötigt werden, um den Blutfluss von den Spiralarterien in den intravaskulären Raum zu etablieren. Ist jedoch die Trophoblasteninvasion am Anfang des zweiten Trimesters beendet und damit die Transformation der Spiralarterien abgeschlossen, wird weniger CO und damit weniger HO-2 benötigt. Weitere Studien konnten die Expression sowohl von HO-1 als auch von HO-2 in der humanen Plazenta bestätigen (McLean *et al.* 2000, Yoshiki *et al.* 2000, Zenclussen *et al.* 2003).

Auch in anderen Spezies konnte gezeigt werden, dass HO-1 und HO-2 in der Plazenta exprimiert werden. In der Plazenta vom Meerschweinchen konnte in Zellen von fetalen Blutgefäßen, die sich in den chorionischen Zotten befinden, eine Expression von HO-1 und HO-2 nachgewiesen werden (Odrich *et al.* 1998). Odrich beschrieb weiterhin, dass sich die Aktivität der HO im Laufe der Schwangerschaft verändert und kurz vor der Geburt am stärksten ist. Ihara und Mitarbeiter (1998) untersuchten die mRNA und Proteinmengen von HO-1 und HO-2 der Plazenta im Vergleich zu anderen Organen der Ratte und konnten so zeigen, dass die mRNA Menge von HO-1 in der Plazenta 14fach höher war als in der Leber. Die Mengen der HO-1 waren auch im Vergleich zu der Milz, dem Organ mit der höchsten Menge an HO-1 in erwachsenen Ratten, stark erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von HO-1 und HO-2 ausschließlich in den Trophoblasten erfolgte. Da die Trophoblasten für den Austausch von mütterlichen und fötalen Komponenten verantwortlich sind, scheinen diese auch für den Häm-Metabolismus in der Plazenta verantwortlich zu sein. Ähnlich wie Lyall beobachteten Ihara und Mitarbeiter (1998), dass die mRNA Mengen an HO-1 und HO-2 im Laufe der Schwangerschaft abnehmen. In Mäusen konnten ebenfalls im placentalen Gewebe als auch in dezidualen Gewebe HO-1 und HO-2 nachgewiesen werden (Zenclussen *et al.* 2002).

Eine der ersten Gruppen, die zwischen der Expression von HO und Schwangerschaftskomplikationen, genauer Präeklampsie, einen Zusammenhang postulierte, war Ahmed und Mitarbeiter (2000). Sie beobachteten, dass bei Frauen mit Präeklampsie die Expression von HO-1 im Vergleich zu Frauen mit einer normalen Schwangerschaft, welche in der gleichen Schwangerschaftswoche waren, signifikant reduziert war. Eine verringerte Expression von HO-2 konnte sowohl in Frauen mit Präeklampsie als auch in Frauen mit einer fetalen Wachstumsstörung beobachtet werden, wenn man sie mit normalschwangeren Frauen

der gleichen Schwangerschaftswoche verglich (Barber *et al.* 2001). Eine reduzierte Expression von HO konnte in Trophoblasten von Frauen beobachtet werden, die Feten mit einer intrauterinen Wachstumsstörung aufwiesen (Wang und Yu 2002). Die Ergebnisse von Zenclussen und Mitarbeiter (2003) belegten, dass in Frauen mit spontanen Aborten die HO-2 Expression in invasiven Trophoblasten, Endothelzellen und Syncytiotrophoblasten, im Vergleich zu den normal-schwangeren Frauen, stark reduziert war. Ähnliche Beobachtungen machten die Autoren auch an Patientinnen mit Präeklampsie. Auch hier war die HO-2 Expression in invasiven Trophoblasten und Syncytiotrophoblasten im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen verringert. In Mäusen, welche am Tag 5 der Schwangerschaft Stress in Form einer 24 Stunden langen Beschallung mit Ultraschallgeräuschen ausgesetzt wurden, wie in Mäusen mit einem IL-12 induzierten Abort, konnten verringerte mRNA Level von HO-1 als auch von HO-2 in plazentalem und deziduaem Gewebe, im Vergleich mit der Kontrollgruppe CBA/J x DBA/2J, beobachtet werden (Zenclussen *et al.* 2002). Studien, wie sich HO bei den Mausmodellen für den spontanen Abort und der Präeklampsie verhält, waren zu Beginn dieser Doktorarbeit nicht bekannt. Die Daten über HO in Laufe der Schwangerschaft lassen den Schluss zu, dass die HO in der Schwangerschaft eine genauso große Rolle wie bei Transplantationen spielt und dass die Mechanismen, die die HO zu einem schützenden Molekül macht, in der Schwangerschaft und der Transplantation ähnlich sind.

## 2.8 Schwangerschaftsimmunologie

Die T-Zellen stellen einen wichtigen Schalt- und Kontrollpunkt im Immunsystem dar. Nur mit einem normalen T-Zell-Muster hat der Körper eine effiziente Immunabwehr, da gerade diese Zellen darüber entscheiden, wann eine Abwehrreaktion notwendig ist und wann nicht (Holländer 2006). Die T-Zellen sind daher für die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst verantwortlich, was für die Verhinderung von Autoimmunerkrankungen essentiell ist (Holländer 2006). Bei einer Schwangerschaft besitzt jedoch der Fetus zur Hälfte väterliche Antigene und müsste somit vom Immunsystem als Nicht-Selbst erkannt werden, jedoch wird der Fetus vom mütterlichen Immunsystem nicht angegriffen. Das Immunsystem spielt somit im Laufe der Schwangerschaft eine besondere Rolle.

### 2.8.1 Die Rolle der T-Zellen in der Immunantwort

Die T-Zellen, die MHC-II erkennen, werden später zu T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und tragen CD4, wohingegen die MHC-I erkennenden Lymphozyten zu CD8 exprimierenden zytotoxischen T-Zellen werden (Janeway 2001).

Nach der Reifung im Thymus gelangen die Th-Zellen über den Blutkreislauf in den Körper, wo sie zwischen den verschiedenen Organen hin und her wandern, bis sie über Antigenkontakt aktiviert werden und ihre Funktion erfüllen (Alberts 2005). Treffen die T-Zellen in der Peripherie auf ihr Antigen, so gehen sie in ein Aktivierungsstadium über. Kommt es dann zum Eintritt in das Effektorstadium, so organisieren die CD4+-T-Zellen die Abwehr gegen das entsprechende Antigen. Die Th-Zellen interagieren mit Hilfe von Zytokinen und durch direkten Kontakt von Oberflächenmolekülen mit anderen Zellen. Anhand des Zytokinmusters lassen sich die Th-Zellen in verschiedene Untergruppen unterteilen, die sich auch spezifischen Aufgaben zuordnen lassen.

Unter Th0-Zellen versteht man frisch aktivierte Th-Zellen, die noch in der Lage sind, sowohl Th1 als auch Th2 spezifische Zytokine zu bilden. Man nimmt an, dass sie nur ein Durchgangsstadium in die eine oder andere Richtung darstellen. Wahrscheinlich können sie aber auch bei der Abwehr von Pathogenen eigenständige Funktionen wahrnehmen.

Die Th1-Zellen sind durch die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und - $\beta$  gekennzeichnet (Mosmann und Coffman 1989). Die Hauptfunktion der Th1-Zellen ist die zellvermittelte Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, wie Viren, Parasiten und Bakterien.

Werden die T-Zellen allerdings zu Th2-Zellen polarisiert, so liegt dem meist das Interleukin IL-4 zugrunde, dass, wenn es in ausreichender Menge bei der Antigenpräsentation vorhanden ist, die T-Zelle zur Produktion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 anregt (Mosmann und Coffman 1989). Diese Zytokine haben eine Th1-abortive Wirkung und somit einen antiinflammatorischen Effekt. Th2-Zellen haben eine wichtige Rolle auf der humoralen Seite der Immunantwort. Außerdem können sie Mastzellen und eosinophile Granulozyten aktivieren und spielen somit bei der Bekämpfung von Parasiten eine große Rolle. Die Th2-Zellen spielen ebenfalls bei der Ausbildung allergischer Reaktionen eine wichtige Rolle.

Die letzte Th-Zellpopulation wurde erst recht spät beschrieben (Chen *et al.* 1994b). Die Th3-Zellen zeichnen sich besonders durch die Produktion von TGF- $\beta$  aus.

Für eine effektive Immunantwort muss ein ausgewogenes Verhältnis der verschiedenen Th-Zellpopulationen vorliegen. Dieses Verhältnis wird unter anderem durch die

Zytokineproduktion der jeweiligen T-Zellen beeinflusst, somit sind die Th1- und Th2-Zellen in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen bzw. zu hemmen.

### 2.8.2 Das Th1/Th2/Th3 Paradigma in der Schwangerschaft und seine Widersprüche

Eine erfolgreiche Schwangerschaft wird mit einer Überproduktion von Th2-Zytokine assoziiert (Lin *et al.* 1993, Chaouat *et al.* 1995, Piccinni *et al.* 1998). Bei schwangeren Frauen konnte nachgewiesen werden, dass deziduale CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant mehr Typ-2-Zytokine IL-4, IL-10 aufwiesen, als bei Frauen mit einem habituellen Abort (Piccinni *et al.* 1998). Im Laufe der murinen Schwangerschaft wurden an der fetomaternalen Grenze die Typ-2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 als dominierend nachgewiesen (Lin *et al.* 1993). In dem Mausmodell für spontanen Abort konnten Chaouat und Mitarbeiter (1995) zeigen, dass die Behandlung mit rekombinantem IL-10 oder anti-IFN- $\gamma$  die Abortrate reduziert.

Bei Schwangerschaftskomplikationen im Menschen und in der Maus hingegen wurde ein immunologisches Ungleichgewicht der Th1/Th2 Zytokine zugunsten der Th1-Zytokine beschrieben (Lin *et al.* 1993, Clark *et al.* 1999, Raghupathy *et al.* 1997, 1999). Die proinflammatorischen Typ-1 Zytokine wurden daher mit verschiedenen Schwangerschaftskomplikationen wie spontaner Abort oder Präeklampsie in Verbindung gebracht.

Bei Frauen mit habituellen Aborten konnte ein Th1-Ungleichgewicht beobachtet werden (Raghupathy *et al.* 1997, 2000, Saito *et al.* 2000). Haimovici und Mitarbeiter (1991) zeigten, dass in Anwesenheit von Typ-1 Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ , es zu Wachstumsstörungen von Trophoblastenzellen kam. In dem Mausmodell für einen spontanen Abort konnte eine Überexpression von IL-6 an der fetomaternalen Grenze beobachtet werden (Zenclussen *et al.* 2003).

In Frauen mit Präeklampsie wurden im Zuge eines systemischen Auftretens von aktivierten mütterlichen Entzündungszellen erhöhte Mengen von Th1-Zytokinen, hauptsächlich TNF- $\alpha$ , beobachtet (Olan *et al.* 1985, Greer *et al.* 1989, Stark 1993, Sacks *et al.* 1997, Darmochwal-Kolarz *et al.* 1999, Saito *et al.* 1999).

Das Typ 3-Zytokin TGF- $\beta$  scheint ebenfalls eine wichtige Rolle im Verlauf der Schwangerschaft zu spielen (Gorivodsky *et al.* 1999). Gorivodsky und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass im Mausmodell für den spontanen Abort die Menge von TGF- $\beta$ 2-mRNA im Vergleich zu den normal-schwangeren Kontrolltieren um die Hälfte reduziert war. Weiterhin scheint TGF- $\beta$  besonders für das Überleben des Embryos wichtig zu sein, da es in TGF- $\beta$  KO-

Mäusen bereits um den Tag 15,5 der Schwangerschaft zu einer sehr hohen embryonalen Letalität kommt (Dünker und Kriegelstein 2002).

In den letzten Jahren zeigten jedoch verschiedenste Studien, dass dieses Th1/Th2/Th3 Paradigma nicht als eine übergeordnete Lösung für eine erfolgreiche Schwangerschaft herangezogen werden kann und den oben zitierten Daten zum Teil widersprechen (Svenson *et al.* 2001, Bates *et al.* 2002, Chaouat *et al.* 2002, Zenclussen *et al.* 2002b)

In Mäusen, die nicht in der Lage waren IL-10 und IL-4 zu exprimieren, kam es dennoch zu normalen Schwangerschaften. Somit ist die Th2 -Zytokine Produktion von IL-4 und von IL-10 nicht ausschlaggebend für eine erfolgreiche Schwangerschaft (Svenson *et al.* 2001). IL-10 ist zwar nicht essentiell für eine erfolgreiche Schwangerschaft, jedoch konnten White und Mitarbeiter (2004) zeigen, dass IL-10 ein wichtiger Wachstumsfaktor sowohl der Embryonen als auch postpartal ist. Im Vergleich zu normalen Schwangerschaften wurden bei habituellen Aborten erhöhte Mengen von Typ-2 -Zytokin gemessen (Bates *et al.* 2002).

Fallon und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass es in KO-Mäusen, bei denen die vier Gene IL-4, IL-5, IL-9, und IL-13 deaktiviert wurden, zu normalen Schwangerschaften kommt. Es konnte somit gezeigt werden, dass diese Th2-Zytokine nicht für das Überleben der Feten notwendig sind.

Bei Frauen mit einem spontanen Abort wurden in dezidualen und peripheren Blutzellen verringerte Mengen an IL-12 im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen gemessen, welches für die Induktion von Th1-Zellen verantwortlich ist (Zenclussen *et al.* 2002b). Bei Frauen mit habituellen Aborten konnte man im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen eine verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion beobachten (Bates *et al.* 2002). Ostojic und Mitarbeiter (2003) zeigten, dass in dem Mausmodell für den spontanen Abort die Menge von IL-18 im Vergleich mit den normal-schwangeren Kontrollmäusen signifikant reduziert war.

Im Gegensatz zu dem starren Th1/Th2/Th3 Paradigma scheint die Th1/Th2 Balance sich im Laufe der Schwangerschaft zu verändern. So konnten Hunt und Mitarbeiter (1990) und Croy und Mitarbeiter (1991) zeigen, dass bestimmte Zytokine, wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche nach dem Th1/Th2/Th3 Paradigma als schwangerschaftsschädigend eingestuft waren, besonders im Laufe der Implantation eine wichtige Rolle spielen. Es konnte auch bereits vor der eigentlichen Implantation zwischen dem 1. und 3. Tag der murinen Schwangerschaft erhöhte mRNA Mengen von TNF- $\alpha$  und IL-1 im Uterus beobachtet werden (McMaster *et al.* 1992, Sanford *et al.* 1992).

### 2.8.3 HO-1 und dessen Interaktion mit dem Immunsystem

Eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, dass zwischen der Expression von HO-1 und verschiedenen Komponenten des Immunsystems, wie bestimmte Zytokine, eine starke Interaktion besteht. Otterbein und Mitarbeiter (2000) beschrieb, dass erhöhte Mengen an CO die Expression von LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen inhibierte. Weiterhin konnten die Autoren erhöhte Mengen von IL-10 in Makrophagen beobachten. Lee und Chau zeigten weiterhin, dass es zwischen HO-1 und IL-10 eine Interaktion gibt und dass IL-10 ein starker Förderer der HO-1 Expression in Makrophagen ist (2002). Bei Herztransplantationen konnte man ebenfalls bei erhöhten Mengen an HO-1 einen Anstieg an IL-10 beobachten (Yamashita *et al.* 2006).

Dass erhöhte Mengen an HO-1 auch einen Einfluss auf Th1 Zytokine haben, konnte ebenfalls von verschiedenen Autoren gezeigt werden. So zeigten Woo und Mitarbeiter (2000), dass es bei einer erhöhten Produktion von HO-1 durch Behandlung von Co-PP zu verminderten Produktionen von IFN- $\gamma$  in einem Mausmodell für graft-versus-host-disease (GVHD) kommt. Bei Nierentransplantationen in der Ratte konnten Tullius und Mitarbeiter (2002) nachweisen, dass es nach einer erhöhten Expression von HO-1 nicht nur zu verringerten Mengen an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mRNA in dem Transplantat kommt, sondern auch zu einer verringerten Infiltration von Monozyten, Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-Zellen in das Transplantat.

Bei Lebertransplantaten konnte man ebenso einen Zusammenhang zwischen der Menge von HO-1 und dem Zytokinprofil im Transplantat feststellen. Bei hohen Mengen an HO-1 konnte man eine Dominanz der Th2 Zytokinen IL-4 und IL-10 beobachten; bei verringerten Mengen von HO-1 wurden hauptsächlich die Th1 assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 beschrieben (Ke *et al.* 2001).

Weiterhin kam es bei erhöhten Mengen von HO-1 zu einer signifikanten Erhöhung von Foxp3, TGF- $\beta$  und CTLA4, was auf eine Rolle von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs) hindeutet (Yamashita *et al.* 2006).

Bei Schwangerschaften scheint es einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der Expression von HO-1 und dem Zytokinprofil zu geben. So konnten Zenclussen und Mitarbeiter (2002) zeigen, dass es bei einem Th1-induzierten Schwangerschaftsabbruch zu einer Verminderung der HO-1 und HO-2 Konzentrationen kommt. Sie postulierten, dass es durch erhöhte Mengen an Th-1-Zytokinen zu verringerten Mengen von HO in Trophoblasten und Endothelzellen kommt, was zu erhöhten Mengen von freiem Häm führt, welches toxisch ist und weitere Th1-Zytokine in das Gewebe lockt.



## 2.9 Stickstoffoxid-Synthase

### 2.9.1 Funktion von Stickstoffoxid und Stickstoffoxid-Synthase im Rahmen der Schwangerschaft

Stickstoffoxid (NO) ist ein hoch reaktives und kurzlebiges Radikal (Halbwertszeit: 10-12sec), was bei einer Vielzahl von biologischen Funktionen, wie Erweiterung der Blutgefäße, Neurotransmissionen oder auch bei Immunreaktionen, eine große Rolle spielt (Berdeaux 1993). Weiterhin scheint NO eine wichtige regulatorische Rolle in verschiedenen Reproduktionsprozessen des weiblichen Körpers, wie bei der Ovulation, Implantation, beim Schwangerschaftsverlauf, den Wehen und der Geburt, zu übernehmen (Sladek *et al.* 1997, Chwalisz und Garfield 2000). Bei der Präeklampsie spielt NO eine große Rolle bei der Erweiterung der Blutgefäße, da die Freisetzung von NO die Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) erhöht, was wiederum Einfluss auf die Proteinkinase G hat. Durch die Erweiterung der Blutgefäße nimmt NO einen direkten Einfluss auf den Blutdruck

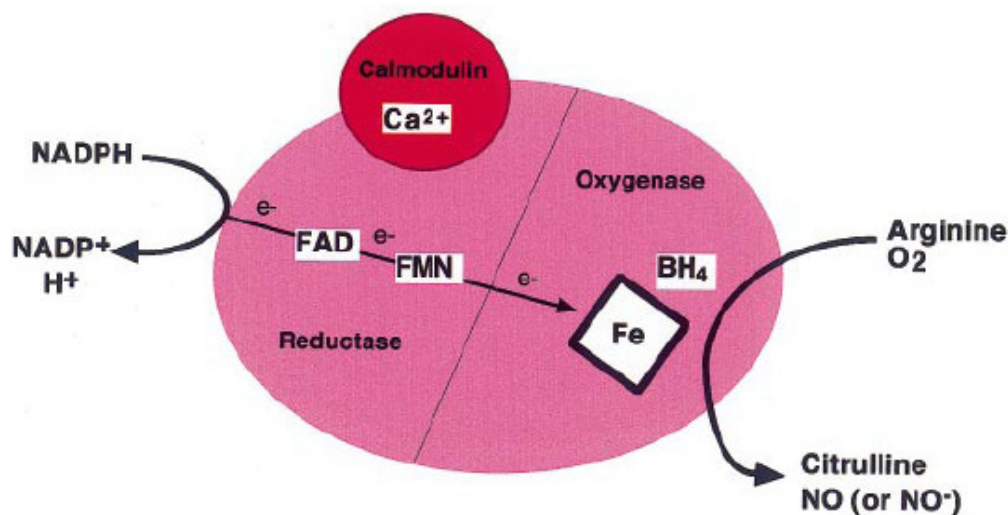


Abbildung 4: Umwandlungsprozess von L-Arginin in L-Citrullin (Alderton *et al.* 2001)

NO hat zusätzlich einen inhibitorischen Effekt auf Endothelin. Endothelin wirkt gefäßverengend und kann daher zu erhöhtem Blutdruck führen (Napoletano *et al.* 2000). Stickstoffoxid entsteht durch den Abbau von L-Arginin durch die Stickstoffoxidsynthase (NOS). Dieses Enzym wandelt unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH L-Arginin in L-Citrullin um. Als Nebenprodukt dieses Prozesses entsteht NO (siehe Abb. 4).

Drei Isoformen von NOS wurden bisher identifiziert, welche beim Menschen eine Homologie  $51\pm 57\%$  aufweisen. Es handelt sich um Produkte von verschiedenen Genen, welche auf unterschiedlichen Chromosomen sitzen und die Unterschiede in der Regulation, katalytischen Eigenschaften und Sensibilität auf Inhibitoren aufweisen. Die erste Isoform, welche in neuralem Gewebe identifiziert wurde, ist nNOS (oder auch NOS-1). iNOS (oder auch NOS-2) ist im Gegensatz zu den anderen Isoformen unter anderem durch inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , induzierbar und kommt hauptsächlich in Zellen des Immunsystems vor (Griffith und Stuehr 1995; Snyder *et al.* 1995), wurde aber auch in der humanen Plazenta nachgewiesen (Myatt *et al.* 1997).

Die letzte Form ist eNOS (oder auch NOS-3), welche erstmalig in vaskulären Endothelzellen beschrieben wurde, wird aber auch ähnlich, wie iNOS in Endothelzellen und Trophoblasten der humanen Plazenta exprimiert (Myatt *et al.* 1997). Im Gegensatz zu iNOS benötigen eNOS und nNOS Calcium zur Aktivierung (Griffith und Stuehr 1995; Snyder *et al.* 1995).

### **2.9.2 Funktion von NOS während der Schwangerschaft**

Wie bereits erwähnt, spielt NO in verschiedenen Reproduktionsprozessen des weiblichen Körpers eine wichtige Rolle. Beispiele hierfür sind die Ovulation, Implantation, beim Schwangerschaftsverlauf, den Wehen und der Geburt. Die genaue Rolle von NO im Laufe der Schwangerschaft scheint jedoch Speziesabhängig zu sein und bleibt beim Menschen bei der normalen Schwangerschaft wie auch bei der Präeklampsie umstritten (Sladek *et al.* 1997). In der humanen Plazenta werden sowohl iNOS als auch eNOS in Endothelzellen und Trophoblasten exprimiert, wobei im plazentalen Endothelium der Frau eNOS für den Großteil des gebildeten NO verantwortlich ist (Myatt *et al.* 1997). Nasiell und Mitarbeiter (1998) beschrieb, dass die Expression von eNOS in den Plazenten von Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen reduziert ist.

Innerhalb des Plazentabettes konnte man bei Patientinnen mit Präeklampsie verringerte Mengen an iNOS und eNOS beobachten. Man postulierte daher, dass die verringerte NO Produktion, welche durch die verringerte Expression von NOS ausgelöst wird, mit dem erhöhten Blutfluss innerhalb des Uterus und der Plazenta zusammenhängt (Beinder *et al.* 1999). Nelson und Mitarbeiter (2000) demonstrierten, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft mit erhöhten Mengen an eNOS in humanen Arterien des Uterus in Verbindung steht. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige NOS Aktivität war in Arterien des Uterus von schwangeren Frauen 8-mal höher als in Arterien von nicht-schwangeren Frauen.

Die Aktivität von NOS wurde in Trophoblasten aller drei Trimester untersucht und es zeigte sich, dass die Aktivität von NOS, ähnlich wie die Aktivität von HO (Lyall *et al.* 2000), in den Trophoblasten im ersten Trimester der Schwangerschaft am höchsten war und im Laufe der Schwangerschaft abnimmt (Ramsay *et al.* 1996), wodurch man eine Interaktion zwischen HO-1 und NOS vermuten kann. Ein weiterer Faktor, der die Interaktion zwischen HO und NOS vermuten lässt, ist die Tatsache, dass für den Aufbau von allen drei Formen von NOS Häm benötigt wird, welcher von der HO jedoch abgebaut wird.

### 2.9.3 Interaktion zwischen HO-1 und NOS

In verschiedenen Systemen wurde eine regulatorische Interaktion zwischen den beiden Molekülen HO-1 und iNOS postuliert (Abb. 5) (Maines 1997, Datta *et al.* 2002). NOS ist ein Hämprotein, somit ist die Produktion von NOS von der Aktivität von HO-1 abhängig.

Bei zu hohen Mengen an HO-1 würde es zu einem vermehrten Abbau von Häm kommen, was wiederum die Bildung von NOS verhindern würde, da dieses das Häm-Moleküle zur Synthese benötigt (White und Marletta 1992, McMillan *et al.* 1992, Wang *et al.* 1994). Beim Abbau von Häm durch HO kommt es zur Bildung von CO. Dieses CO ist in der Lage sich an bereits vorhandenes NOS anzulagern und dieses damit zu inaktivieren (White und Marletta 1992, McMillan *et al.* 1992).

Für den Abbau vom Häm durch HO, wie auch für die Bildung von NO durch NOS, wird NADPH benötigt. Die Konzentration von HO ist jedoch

in den Zellen sehr viel höher als die von NOS, wodurch das NADPH eher für den Abbau vom Häm durch HO verbraucht wird (Maines *et al.* 1993).

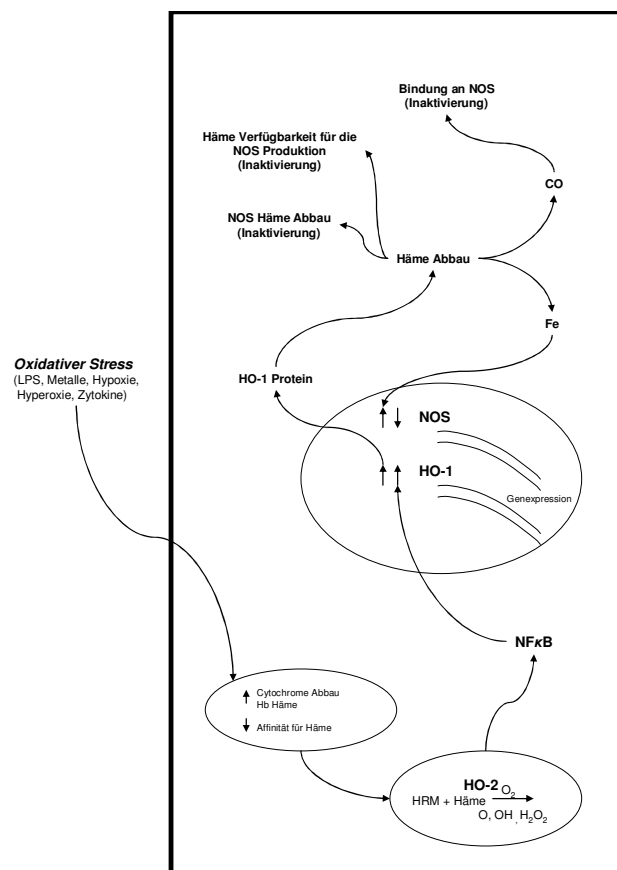


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion zwischen Hämoxxygenase und dem Stickstoff Oxid Synthase System (modifiziert nach Maines 1997)

## 2.10 Apoptose

Die Apoptose (*griechisch für „fallende Blätter“*) ist ein programmierter Zelltod, der durch die Zelle aktiv reguliert wird und daher genetisch kodiert ist. Charakteristisch für die Apoptose ist der Verlust von Zellverbindungen und Mikrovilli; es kommt zur Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, cytoplasmatischen Kontraktion und dichter Packung von Mitochondrien und Ribosomen (Janeway 2001). Die Apoptose ist für eine ordnungsgemäße Embryogenese und Metamorphose, Gewebemöostase und die normale Funktionalität des Immunsystems notwendig (Grimm 2003).

Zu Beginn der Apoptose kommt es durch die Bindung des Fas-Ligand (FasL) zur Bildung des Fas-Trimeres (Abb. 6). Die

Todesdomänen, welche an den cytoplasmatischen Schwänzen von Fas hängen, kommen sich durch die Bildung des Trimeres näher, was dazu führt, dass sich die verschiedenen Adaptorproteine, unter anderem das Protein FADD, an die Todesdomänen anlagern. FADD geht dann über eine zweite Todesdomäne Wechselwirkungen mit spezifischen Proteasen ein.

Diese Proteasen, welche man als Caspasen bezeichnet, spielen im weiteren Verlauf der Apoptose eine

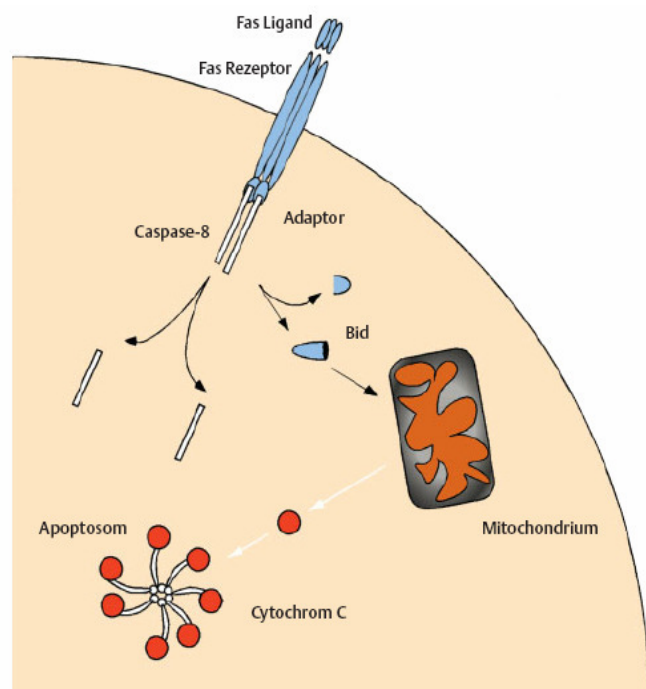


Abbildung 6: Ablauf und Komponenten der Apoptose (Grimm 2003)

wichtige Rolle. An das Protein FADD angelagerte Caspase-8-Moleküle sind in der Lage, sich durch die Abspaltung einer aktiven Caspasendomäne selbst, aber auch andere Caspasen zu aktivieren (Janeway 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung der Caspasen stellt das Cytochrom c dar. Zu Beginn der Apoptose kommt es zur proteolytischen Spaltung des Proteins Bid, welches zu der Bcl-2-Protein-Familie gehört (Hengartner 2000). Es wurden verschiedene Proteine entdeckt, welche strukturell ähnlich sind und daher als Bcl2-Protein-Familie zusammengefasst werden (Gross *et al.* 1999). In dieser Familie findet man sowohl pro-apoptotische (Bax, Bcl-xs, Bad u.a.) als auch anti-apoptotische Proteine (Bcl2, Bcl-xl, Bag-1, u.a.) (Gross *et al.* 1999). Es folgt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Die Freisetzung apoptose-assoziierten Moleküle, wie Cytochrom c und die mitochondriale

Integrität wird im Wesentlichen durch die Bcl2-Proteine-Familie kontrolliert. Die Mechanismen, die zu einer Freisetzung von Cytochrom c und anderen Molekülen ins Cytosol führt, sind noch nicht genau geklärt. Es gibt aber verschiedene Modelle (Gross *et al.* 1999; Hengartner 2000) dafür, wie die Bcl-2 Moleküle darauf Einfluss nehmen. Vier dieser Modelle seien hier genannt: 1. Bcl-2-Proteine bilden Kanäle in der äußeren Membran der Mitochondrien aus. 2. Die Bcl-2 Proteine interagieren mit anderen Proteinen der mitochondrialen Membran und induzieren die Bildung von Membrankanälen. 3. Die Bcl-2 Proteine induzieren einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, so dass die mitochondrialen Proteine ins Cytosol diffundieren können. 4. Die mitochondrialen Membrankanäle werden von Bcl-2 Proteinen reguliert (Gross *et al.* 1999; Hengartner 2000).

Im Zytosol reagiert das Cytochrom c dann mit dem Protein Apaf-1 und bildet mit diesem das Apoptosom, welches für die Induktion von Caspasen verantwortlich ist (Janeway 2001). Als Folge einer Caspasenkaskade kommt es zur Aktivierung der caspasenaktivierbaren DNase (CAD). CAD dringt anschließend in die Zellkerne ein und spaltet die dort vorliegende DNA in 200 Basenpaar-große-Fragmente und beendet somit den Ablauf der Apoptose (Janeway 2001).

### **2.10.1 Apoptose im Laufe der Schwangerschaft**

Apoptose findet in allen Trimenon der Schwangerschaft in der Plazenta statt (Kim *et al.* 1995). Verschiedene Studien zeigen, dass die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Neuordnung und Alterung der Plazenta spielt (Smith *et al.* 1997, Axt *et al.* 1999, Chan *et al.* 1999, Huppertz *et al.* 2000, Levy *et al.* 2000). Die Häufigkeit des Auftretens der Apoptose variiert stark im Verlauf der Schwangerschaft. Ihren Höhepunkt erreicht sie im dritten Trimester. Zu dem Zeitpunkt weisen 0,07 bis 0,25% der Zyto- und Synzytiotrophoblasten Zeichen für Apoptose auf (Kim *et al.* 1995, Reed *et al.* 1994). Es muss bemerkt werden, dass über 50% der apoptotischen Zellen in der Plazenta Trophoblastzellen sind und nur 5% Endothelzellen. Bei der Differenzierung und der syncythialen Fusion von humanen Trophoblasten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Caspase-8 als ein wichtiger Aktivator der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 notwendig ist (Black *et al.* 2004). Im Laufe der Schwangerschaft konnte eine Expression von Bcl-2 in Zyto- und Synzytiotrophoblastzellen nachgewiesen werden (Kim *et al.* 1995).

Apoptose spielt auch bei der Embryogenese eine wichtige Rolle und es konnte gezeigt werden, dass Missbildungen und der Tod des Embryos in der Gebärmutter durch

Abweichungen des normalen Ablaufs der Apoptose ausgelöst werden können (Brill *et al.* 1999, Torry *et al.* 2003).

### **2.10.2 Der Einfluss von HO-1 auf die Apoptose**

Die wichtigste Rolle der Hämoxxygenase ist der Abbau von freiem Häm. Es konnte gezeigt werden, dass HO aber noch weitere wichtige biologische Funktionen besitzt. Es wurde postuliert, dass HO gewebesetzende, entzündungshemmende und anti-apoptotische Funktionen aufweist und somit den programmierten Zelltod blockiert.

In verschiedenen Tiermodellen für Entzündungsreaktionen, Hypoxie und Organtransplantationen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hemmung der Apoptose kommen kann, wenn die HO-1 Expression erhöht ist. Wenn die HO-1 Aktivität hingegen blockiert wird, kommt es zu einem Anstieg der Apoptosesrate in den Tieren (Hancock *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Vulapalli *et al.* 2002).

Soares und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass Endothelzellen nach einer erhöhten Expression von HO-1 vor einer TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose geschützt waren. Ein Schutz vor einer TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose konnte auch dadurch erreicht werden, in dem die Endothelzellen extrazellulärem Häm ausgesetzt wurden, was wiederum zu einer Erhöhung von HO führte (Brouard *et al.* 2000). Die Mechanismen, wodurch HO die Zellen vor Apoptose schützt, sind bisher noch nicht genau geklärt, jedoch wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Ferris und Mitarbeiter (1999) postulierten, dass es in Fibroblasten von Embryonen zu einer verringerten Apoptosesrate durch HO kommt, indem die Menge an zellulärem Eisen, welches als pro-oxidant fungiert, verringert wird. Brouard und Mitarbeiter (2000/2002) zeigten, dass CO, welches bei dem Abbau von Häm durch HO freigesetzt wird, die Zellen durch die Aktivierung von NF $\kappa$ -B vor Apoptose schützen kann. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CO die Freisetzung von Cytochrom c inhibiert (Liu *et al.* 2002b). Studien, welche den Einfluss von HO auf die Apoptoserate bei Mausmodellen für Schwangerschaftskomplikationen untersuchen, sind nicht bekannt.

## 2.11 Ziel der Arbeit

Die immunologischen Mechanismen, die den normalen Verlauf der Schwangerschaft trotz Allogenezität des Feten ermöglichen, wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. Jedoch ist bis heute nicht genau geklärt, wie der Fetus eine Abstoßung durch die mütterliche Immunantwort verhindert.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Hämooxygenase bei der Akzeptanz von Transplantaten eine wichtige Rolle spielt und, da der Fetus als natürlich vorkommendes Allotransplantat angesehen werden kann, es nahe liegt, dass HO auch im Laufe der Schwangerschaft eine Rolle spielen könnte. Diese Hypothese konnte durch verschiedene Studien bestätigt werden, in denen gezeigt werden konnte, dass HO-1 im Laufe der Schwangerschaft exprimiert wird und dass es bei Schwangerschaftskomplikationen zu einer veränderten Expression von HO-1 kommt. Die Mechanismen, über die HO Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf nimmt und ob eine erhöhte Expression HO-1 in der Lage ist, vor einem Abort oder vor Präeklampsie zu schützen, ist bisher noch nicht geklärt.

Die Ziele dieser Doktorarbeit waren:

1. Mit Hilfe des Mausmodells CBA/J x DBA/2J, welches ein anerkanntes Modell für den spontanen Abort darstellt, die HO Expression bei Kontrollmäusen und Abortmäusen zu untersuchen, um mögliche Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Gruppen zu analysieren.
2. Die Expression von HO in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen zu untersuchen, da die bisherigen Humanstudien über die Funktion von HO im Laufe der Präeklampsie kontrovers sind.
3. Zu Analysieren, ob man durch eine therapeutische Behandlung der Mäuse mit Hilfe von Co-PP als HO-1 Induzierer und Zn-PP als HO-1 und HO-2 Hemmer, sowohl im Abortmodell als auch in dem Präeklampsiemodell, durch die Veränderung der HO Expression, einen direkten Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf nehmen kann.
4. Mögliche Mechanismen zu analysieren, mit deren Hilfe HO Einfluss auf den Verlauf der Schwangerschaft nimmt und mit welchen Molekülen HO im Laufe der Schwangerschaft interagiert, wobei besonders der Einfluss von HO auf das NOS-System, die Th1/Th2 Antwort und die Apoptose untersucht werden sollte.

### 3. Material

#### 3.1 Chemikalien und Lösungen

▪ Aceton ( $\text{CH}_3)_2\text{CO}$ )	J.T. Baker, Deventer, NL
▪ Acrylamid 30% (29:1 Solution)	Bio-Rad Laboratories, München, D
▪ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
▪ Ampli-Taq DNA-Polymerase	Eurogentec, Berlin, D
▪ Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, München, D
▪ Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, D
▪ Aquatex	Merck, Darmstadt, D
▪ Benzamidin	Sigma, Steinheim, D
▪ Bovine serum albumine (BSA)	FLUKA Biochemika, Steinheim, D
▪ 3-3 Cholamidopropyltrimethylammonio- 1- propanesulfonate (CHAPS)	FLUKA Biochemika, Steinheim, D
▪ Cobalt- Prothoporphyrin	Sigma, Steinheim, D
▪ Desoxyribobukleotidtriphosphate (dNTPs)	Promega, Mannheim, D
▪ Di-Natriumhydrogenphosphat- Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, D
▪ 1,4-Dithio-DL-Threitol (DDT)	FLUKA Biochemika, Steinheim, D
▪ E-Aminokapron-Säure	Bachem Holding AG, Weil am Rhein, D
▪ ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (Kit)	Amersham Biosciences, Freiburg, D
▪ EDTA, Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen, D
▪ Ethanol 100 Vol%	Herbeta – Arzneimittel, Berlin, D
▪ FCS, Fetal calf serum, Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, D
▪ FicoLite-M	Linaris, Bettingen am Main, D
▪ 1 mM Fluorescein	Fermentas, St.Leon-Rot, D
▪ Glycerin	Sigma, Steinheim, D
▪ Glycin	Calbiochem, Darmstadt, D
▪ Hämalun	Merck, Darmstadt, D



- 10x Hank's Balance Salt Solution (HBSS) Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
- 4-2-Hydroxyethylpiperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) FLUKA Biochemika, Steinheim, D
- Isopropanol FLUKA Biochemika, Steinheim, D
- Kaliumchlorid (KCl) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ) Merck, Darmstadt, D
- Methanol Merck, Darmstadt, D
- Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) Merck, Darmstadt, D
- Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) Merck, Darmstadt, D
- Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) Merck, Darmstadt, D
- Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) Merck, Darmstadt, D
- Natirumazid ( $\text{NaN}_3$ ) Merck, Darmstadt, D
- N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED) Bio-Rad Laboratories, München, D
- Oligo-Desoxynukleotide Metabion, Martinsried, D
- Oligo dThymidin-Nukleotide (odT's) Amersham Biosciences, Freiburg, D
- PBS, phosphate buffered saline DULBECCO'S, PAA Laboratories GmbH, D
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Merck, Darmstadt, D
- Phorbol-12,13-myristylacetat (PMA) Sigma, Steinheim, D
- Ponceau-Rot Sigma, Steinheim, D
- RPMI 1640 Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
- ProSieve<sup>®</sup>, Color Protein Markers Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, Maine, USA
- Roti<sup>®</sup>-HistoKit Roth, Karlsruhe, D
- Saponin Riedel-de Haen, Seelze, D
- Skim Milk Powder (Milchpulver) FLUKA Biochemika, Steinheim, D
- Sodium-dodecyl-sulfate (SDS) Sigma, Steinheim, D
- Tissue Freezing Medium<sup>®</sup> Leica, Nussloch, D
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan Merck, Darmstadt, D

(Tris)

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| ▪ Triton X 100  | Sigma, Steinheim, D                 |
| ▪ Trizma <sup>®</sup> Hydrochlorid (Tris/HCl)         | Sigma, Steinheim, D                 |
| ▪ TRIzol <sup>®</sup>                                 | Invitrogen, Karlsruhe, D            |
| ▪ Trypanblau  | Biochrom AG, Berlin, D              |
| ▪ Tween 20  | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D     |
| ▪ Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Merck, Darmstadt, D                 |
| ▪ Xylol   | J.T.Baker, Deventer, NL             |
| ▪ Zink-Prothoporphyrin IX                             | Frontier-Scientific, Lancashire, UK |

### 3.2 Angesetzte Lösungen

Coomassie-Farbelösung

10% Essigsäure

20% Ethanol

0,1 % Coomassie R250

in Aqua dest.

Coomassie-Entfärbelösung

10% Essigsäure

20% Ethanol

in Aqua dest.

Caspase-3 Lysis-buffer

200 mM HEPES pH 7,4

1% CHAPS

50 mM DTT

20 mM EDTA

ad 1L Aqua dest.

FACS-Puffer

PBS + 1% BSA + 0,1% NaN<sub>3</sub>

FCS-RPMI-Medium

RPMI 1640 + 10% FCS + Pen/Strep

FACS Lysis-Puffer	1,5 M $\text{NH}_4\text{Cl}$ 10 mM $\text{KHCO}_3$ , <u>100 mM EDTA</u> ad 1L Aqua dest.
PBS	136 mM $\text{NaCl}$ 2,7 mM $\text{KCl}$ 17,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ <u>1,8 mM <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></u> ad 1L Aqua dest.
2x Probenpuffer (Western Blot)	62,5 mM Tris HCl, pH8,8 8% $\beta$ -Mercaptoethanol 3% SDS 20% Glycerin <u>0,02% Bromphenolblau</u> in Aqua dest.
Protein Lysis-Puffer	100 ml PBS + 0,1% Triton X 100 +
➤ Proteinaseinhibitoren	2 ml Proteaseinhibitoren
➤ Stammlösung A	1 ml Stammlösung A + 1 ml Stammlösung B
➤ Stammlösung B	100 mM PMSF in Isopropanol 100 mM Benzamidin 100 mM E-Aminocapron-Säure <u>100 mM EDTA</u> in Aqua dest.
Saponinlösung	PBS + 0,1% Saponin
Sammelgel (4%)	Acrylamid ddH <sub>2</sub> O Tris-HCl pH 6,8 TEMED SDS 10%

5 x SDS-Laufpuffer	Tris HCl Glycin <u>SDS</u> in Aqua dest.
Transferpuffer	
Trenngel (7%)	4,7 ml Acrylamid 10 ml ddH <sub>2</sub> O 5 ml Tris-HCl pH 8,8 14µl TEMED 200µl SDS 10%
Trenngel (12%)	Acrylamid ddH <sub>2</sub> O Tris-HCl pH 8,8 TEMED SDS 10%
Tris buffered saline (TBS) für IHC	74 mM Tris 43 mM Tris/HCl <u>150 mM NaCl</u> ad 1L Aqua dest. (pH 7,6)
Tris buffered saline (TBS) für Western Blott	74 mM Tris <u>150 mM NaCl</u> ad 1L Aqua dest. (pH 7,6)

### 3.3 Enzyme, Antikörper und andere biologisch aktive Substanzen

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| ▪ AB Complex/ HRP-Kit        | Dako-Cytomation, Glostrup, DK             |
| ▪ AEC-Substrate + Chromogen  | Dako-Cytomation, Glostrup, DK             |
| ▪ Avidin-Biotin-Blocking Kit | Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CDN |
| ▪ Beta-actin-AK              | Abcam, Cambridgeshire, UK                 |

▪ Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, D
▪ 1,5 mg/ml biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CDN Lot.: 00013145
▪ Caspase-3 colorimetric assay	Sigma, Steinheim, D
▪ CD3-AK: purified anti-mouse CD3	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D
▪ CD4-AK: purified anti-mouse CD4	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 557307
▪ CD8-AK: purified anti-mouse CD8	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 553034
▪ CD25-AK: purified anti-mouse CD25	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 553866
▪ DNase (2u/µl)	Stratagene, Amsterdam, N
▪ IL-4 AK: PE-rat anti mouse IL-4	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 554435
▪ IL-10 AK: PE-rat anti mouse IL-10	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 554467
▪ IFN- $\gamma$ AK: PE anti mouse IFN- $\gamma$	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D Kat.Nr.: 554412
▪ Ionomycin	Sigma, Taufkirchen, D
▪ <i>in situ</i> Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Mannheim, D
▪ M-MLV RT 5x Reaktions Puffer	Promega, Mannheim, D
▪ M-MLV Reverse Transkriptase (200u/µl)	Promega, Mannheim, D
▪ Monensin	Sigma, Taufkirchen, D
▪ Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, D
▪ Polyclonal rabbit anti HO-1	Alexis Biochemicals, Grünberg, D Lot.: L13995/a
▪ Polyclonal rabbit anti HO-2	Stress-Gen, Victoria, CDN Lot.: 909412
▪ Polyclonal rabbit anti eNOS	Santa Cruz, Heidelberg, D Lot.: I2402
▪ Polyclonal rabbit anti iNOS	Santa Cruz, Heidelberg, D Lot.: H272

- |  |   |
|--|---|
| ▪ Primer (TNF- $\alpha$ , HO-1, TGF- $\beta$ , $\beta$ -actin) | Metabion, Martinsried, D                                    |
| ▪ rmIL12   | RD-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D<br>Lot. BB125021       |
| ▪ rmIL2  | RD-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D<br>Lot.: MX124111      |
| ▪ RNase Inhibitor (40u/ $\mu$ l)                               | Promega, Mannheim, D  |
| ▪ Sonde (TNF- $\alpha$ , HO-1, TGF- $\beta$ , $\beta$ -actin)  | Eurogentec, Seraing, B                                      |
| ▪ SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix                       | Stratagene, Amsterdam, NL                                   |
| ▪ TaqMan-Mastermix (2x Reaktionspuffer)                        | Eurogentec, Seraing, B                                      |
| ▪ TNF- $\alpha$ AK: PE labelled anti mouse TNF- $\alpha$       | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D<br>Kat.Nr.: 554419 |

### 3.4 Gebrauchswaren

- |   |   |
|---|---|
| ▪ Aluminium-Folie                         | Gordopack GmbH, Lindlar, D                        |
| ▪ Deckgläser (24 x 46 mm)                 | Paul-Marienfeld, Lauda-Königshofen, D             |
| ▪ Einwegspritzen 1ml                      | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D          |
| ▪ Fettstift (ImmEdge <sup>™</sup> Pen)    | Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CDN         |
| ▪ Filterspitzen (10/100/1000 $\mu$ l)     | Greiner bio-one, Kremsmünster, A                  |
| ▪ Fotopapier (Biomax MR Film)             | Kodak, Stuttgart, D                               |
| ▪ Objektträger (76 x 76 mm)               | R.Langenbrinck, Teningen, D                       |
| ▪ Pasteurpipetten (Plastik)               | Eppendorf, Hamburg, D                             |
| ▪ 5/10/15ml Pipettenspitzen               | BD Biosciences, Heidelberg, D                     |
| ▪ 0.5/1,5/2 ml Reaktionsgefäße            | Eppendorf, Hamburg, D                             |
| ▪ 1,5ml Reaktionsgefäße RNase frei        | Abgene, Hamburg, D                                |
| ▪ 15 und 50ml Reaktionsgefäße             | BD Pharmingen, Heidelberg, D                      |
| ▪ 10/100/1000 $\mu$ l Spitzen             | Eppendorf, Hamburg, D                             |
| ▪ 8 Cap Strips, Ultra clear               | Abgene, Hamburg, D                                |
| ▪ 6/12/96-Well Zellkulturplatten          | Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA |
| ▪ Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>    | Becton Dickinson, Lefont de Claix, F              |
| ▪ Zellsiebe 100 $\mu$ m                   | BD Biosciences, Heidelberg, D                     |
| ▪ Thermo-Fast <sup>®</sup> 96 Non Skirted | Abgene, Hamburg, D                                |

### 3.5 Laborgeräte

- |   |  |
|---|--|
| ▪ ABI Prism® 7700 Sequence Detector         | Applied Biosciences, Lincoln, USA            |
| ▪ Agarose Gelkammer / Netzteil              | Amersham Bioscience, Freiburg, D             |
| ▪ Aglient 8453 Spectrophotometer            | American Laboratory Trading, Groton, USA     |
| ▪ Arbeitsbank, steril (Lamin Air)           | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland      |
| ▪ Blutdruckmessgerät                        | TSE-Systems, Bad Homburg, D                  |
| ▪ Brutschrank                               | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland      |
| ▪ Cell Quest Programm                       | Becton Dickinson, San Jose, USA              |
| ▪ Compact <sub>2</sub>                      | PROTEC Medizintechnik GmbH,                  |
| Röntgenfilmentwicklungsmaschine             | Oberstenfeld, D                              |
| ▪ Electrophoresis Power Supply-ESP 3051 XL  | Amersham Bioscience, Freiburg, D             |
| ▪ FACS-Calibur                              | Becton Dickinson, San Jose, USA              |
| ▪ Geldokumentation                          | Bio-Rad, München, D                          |
| ▪ Handhomogenisator                         | Wheaton, Milleville NJ, USA                  |
| ▪ Homogenisator Ultra Turrax T8             | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland       |
| ▪ Hypercasette                              | Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK     |
| ▪ iCycler iQ Real-Time PCR Detection System | Bio-Rad, München, D                          |
| ▪ Imagequant TL Program                     | Amersham Bioscience, Freiburg, D             |
| ▪ Kühltruhen -80°C                          | New Brunswick Scientific Co., Edison NJ, USA |
| -20°C                                       | Sanyo Electric, Osaka, J                     |
| ▪ Kühlschrank FKS 3600                      | Liebherr, Ochsenhausen, D                    |
| ▪ Laborwaage LA620P                         | Sartorius, Göttingen, D                      |
| ▪ Laborzentrifuge 3K15                      | Sigma, Steinheim, D                          |
| ▪ Laborzentrifuge Rotixa/RP                 | Hettich, Tuttlingen, D                       |
| ▪ Microm Cyro Console                       | Microm, Heidelberg, D                        |
| ▪ Microm Dispensing Console                 | Microm, Heidelberg, D                        |
| ▪ Microm Thermal Console                    | Microm, Heidelberg, D                        |
| ▪ Microtom HM400                            | Microm, Heidelberg, D                        |
| ▪ Mikroskop Olympus BX40                    | Olympus, Hamburg, D                          |
| ▪ Mini Protean 3                            | Bio-Rad, München, D                          |
| ▪ Mastercycler Personal                     | Eppendorf, Hamburg,                          |

- |                                |                               |
|--------------------------------|-------------------------------|
| ▪ Neubauer-improved Zählkammer | Migge, Heidelberg, D          |
| ▪ Kolbenhubpipetten            | Eppendorf, Hamburg, D         |
| ▪ Rotlichtlampe HP1511         | Philips, Hamburg, D           |
| ▪ Thermomixer comfort          | Eppendorf, Hamburg, D         |
| ▪ UV-Mikroküvetten             | Brand, Wertheim, Deutschland  |
| ▪ Wannenbad Julabo SW20        | Julabo Labortechnik, Seelbach |

### 3.6 Tiere und Tierzubehör

BALB/c ♀	Harlan Winkelmann, Borchon, D
BALB/c ♂	Harlan Winkelmann, Borchon, D
CBA/J ♀	Charles River, Les Oncins, F
DBA/2J ♂	Charles River, Wilmington/MA, USA
C57/BL6 ♂	BgVV, Berlin, D
Typ 2-PC Käfig	Ebeco, Castrop-Rauxel, D
Typ 3 Deckel mit Fallbügel DST 2	Ebeco, Castrop-Rauxel, D
Flaschen mit Silikondichtungsring (F 30)	Ebeco, Castrop-Rauxel, D
Streu FS-14	Ssniff, Soest, D
Extrudiertes Futter	Ssniff, Soest, D



## **4. Methoden**

### **4.1 Tierexperimentelle Methoden**

#### **4.1.1 Tierhaltung**

Die Tierhaltung sowie alle durchgeführten Tierexperimente entsprachen den Institutsrichtlinien gemäß den Anforderungen der leitenden staatlichen Behörde in Berlin, dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi). Die durch das Landesamt vergebenen Genehmigungen der durchgeführten Tierversuche waren 0070/03 und 0039/03. Alle tierexperimentellen Versuche wurden nur von entsprechend autorisierten Personen durchgeführt. Folgende Mäusestämme wurden verwendet: männliche DBA/2J-Mäuse (Charles River, Wilmington/MA, USA), weibliche CBA/J-Mäuse (Charles River, Les Oncins, Frankreich), männliche und weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland und BgVV, Berlin, Germany) und männliche C57/BL6-Mäuse (BgVV, Berlin, Germany).

Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht mit einem 12-stündigen Licht-/Dunkelrhythmus, im Forschungshaus der Charité, Campus Virchow, Berlin. Die Käfige, bestehend aus eingeschobenen Draht-Spanndeckeln, wurden regelmäßig vom Pflegepersonal gereinigt. Die Mäuse erhielten täglich über eine Trinkflasche frisches Wasser und über Futterraufen pelletierte Standarddiät (Ssniff).

#### **4.1.2 Verpaarung der Mäuse**

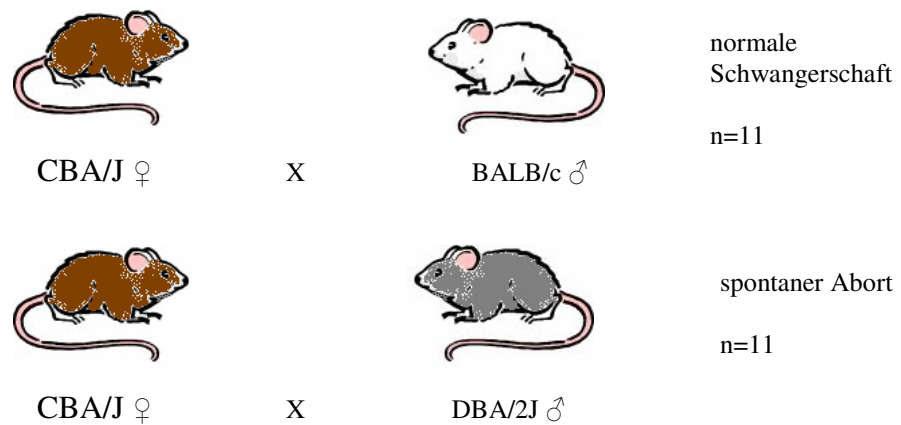
Zwei Monate alte weibliche CBA/J- bzw. BALB/c-Mäuse wurden mit zwei bis vier Monate alten männlichen DBA/2J-, BALB/c- bzw. C57BL6-Mäusen verpaart. Zweimal täglich wurden die weiblichen Mäuse auf einen vaginalen Pfropfen (Inseminationsfleck) hin untersucht. Das Auftreten dieses Merkmals wurde als Tag 0 der Schwangerschaft angesehen. Die Weibchen wurden daraufhin von den Männchen getrennt.

#### **4.1.3 Tiermodell für den spontanen Abort**

Um die Rolle von HO-1 bei einem spontanen Abort untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit drei Tierversuche durchgeführt, wobei bei den ersten beiden Versuchen auf das Tiermodell für den immunologischen Abort (Clark *et al.* 1980) zurückgegriffen wurde. Bei der Abortgruppe wurden weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen

DBA/2J Mäusen verpaart. Als Kontrollgruppe für eine normale Schwangerschaft wurden weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen DBA/2J Mäusen verpaart.

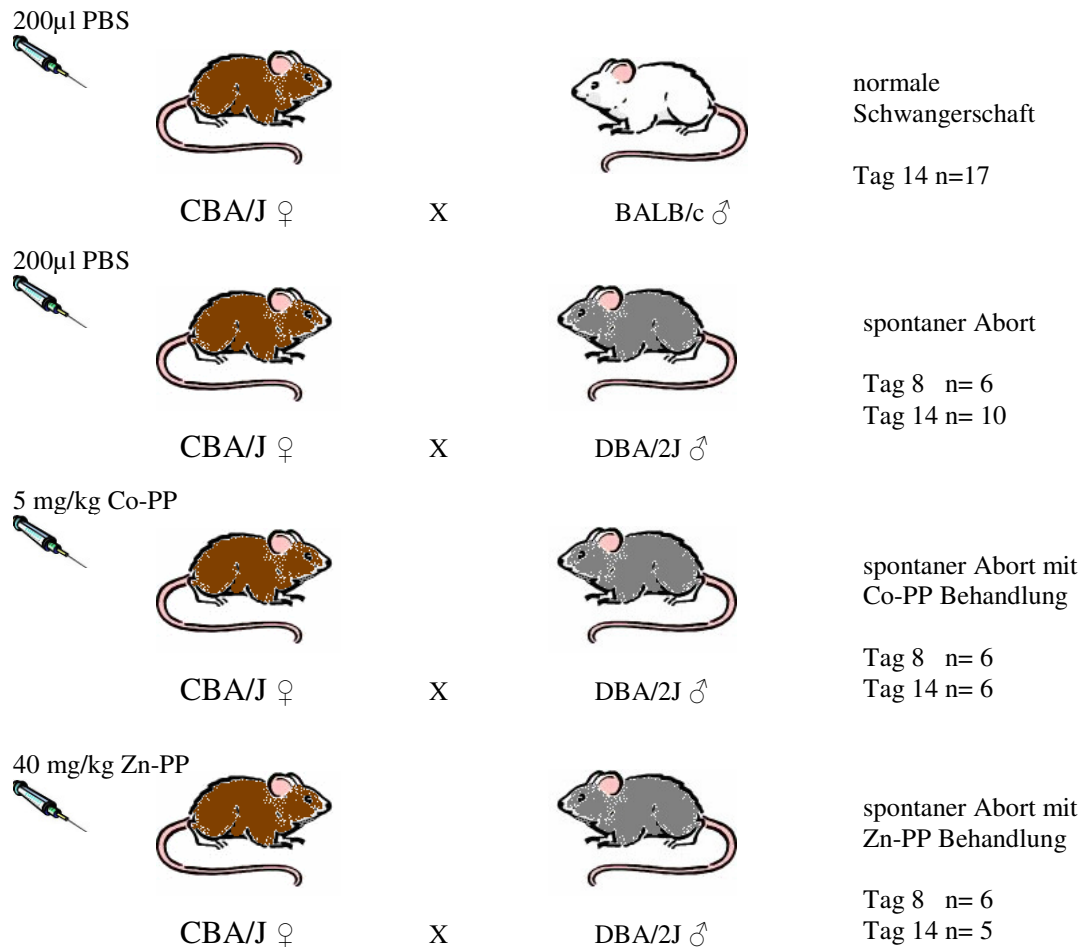
Ziel des ersten Versuches war es, die Expression von HO-1 in Abortmäusen mit normal-schwangeren Mäusen zu analysieren und mögliche Interaktionspartner der HO-1 bei der spontanen Fehlgeburt zu identifizieren. Die Tiere wurden verpaart und am Tag 14 der Schwangerschaft wurden die schwangeren CBA/J Weibchen getötet.



Zeitlicher Versuchsverlauf:

Plug	Sektion
Tag 0	Tag 14

Bei dem zweiten Versuch sollte die Expression von HO-1 durch eine therapeutische Behandlung in den Abortmäusen verändert werden. Die trächtigen CBA/J Weibchen, aus der Verpaarungskombination CBA/J x DBA/2J, wurden hierzu am Tag 4 der Schwangerschaft i.p. mit PBS, 5 mg/kg CO-PP, um HO-1 hochzuregulieren, oder 40 mg/mk Zn-PP, um HO-1 und HO-2 herunterzuregulieren, behandelt. Die trächtigen CBA/J Weibchen, aus der normalen Schwangerschaftskombination CBA/J x BALB/c, wurden als Kontrolle i.p. mit PBS behandelt. Die Mäuse wurden entweder am Tag 8 oder am Tag 14 der Schwangerschaft getötet. Am Tag 8, um die Expression von HO-1 zu einem früheren Zeitpunkt der Schwangerschaft analysieren zu können. Am Tag 14, um bei den Mäusen die HO-1 Expression am Ende der Schwangerschaft zu untersuchen.



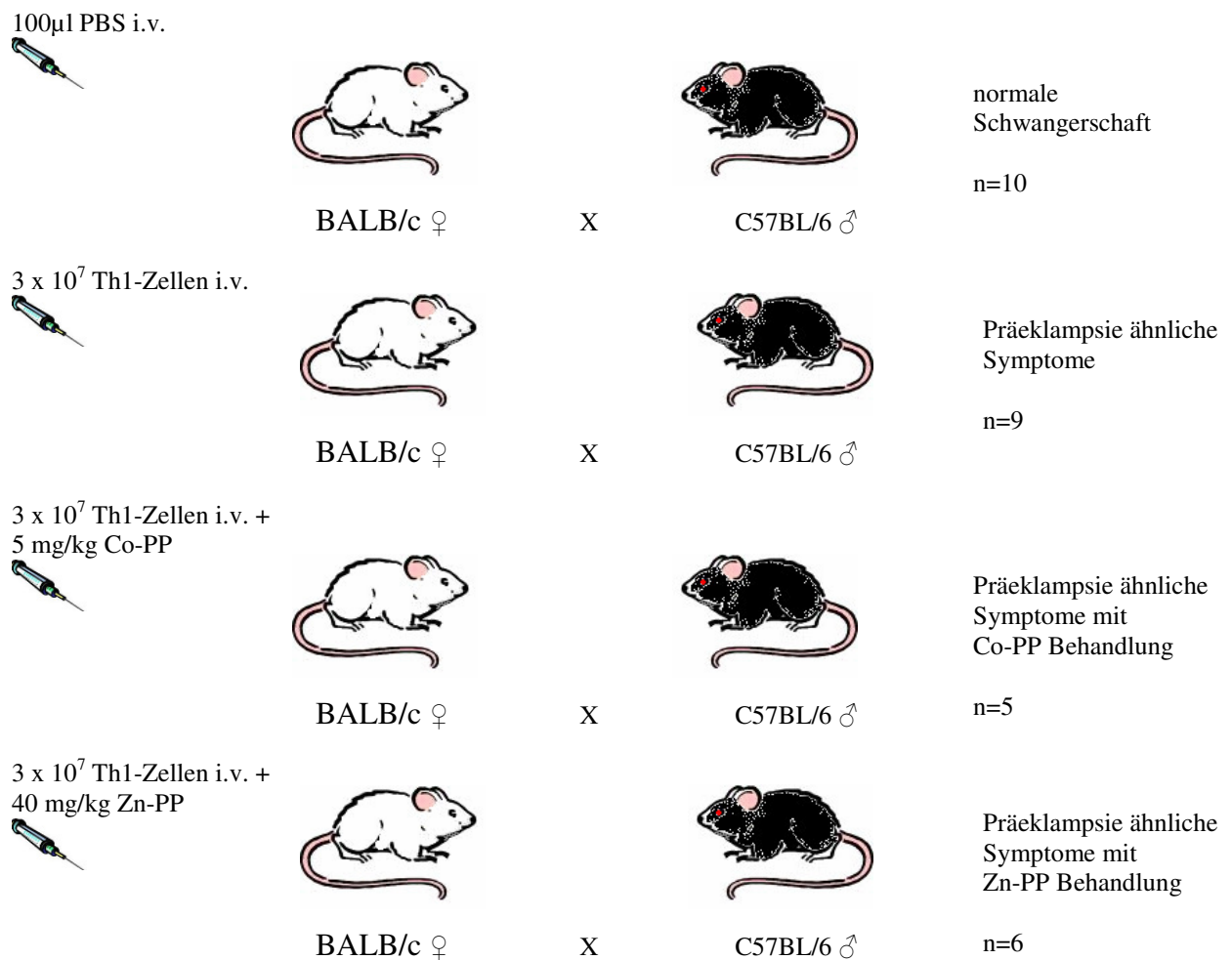
Zeitlicher Versuchsverlauf:

Plug	Behandlung	Sektion	oder	Sektion
Tag 0	Tag 4	Tag 8		Tag 14

#### 4.1.4 Tiermodell für die Präeklampsie

Eine weitere Schwangerschaftskomplikation, bei der die Rolle von HO-1 untersucht wurde, war die Präeklampsie. Anders als bei dem Mausmodell für den spontanen Abort, kann man bei dem Mausmodell für Präeklampsie nicht auf unterschiedliche Verpaarungskombinationen zurückgreifen, sondern muss den Zustand der Präeklampsie künstlich durch eine Injektion von Th1-Zellen herbeiführen. Um die Expression von HO-1 in dem Mausmodell für Präeklampsie analysieren zu können, wurden weibliche BALB/c Mäuse mit männlichen C57BL6 Mäusen verpaart. Um Präeklampsie ähnliche Symptome hervorzurufen, wurde den schwangeren BALB/c-Mäusen am Tag 10 und Tag 12 der Schwangerschaft Th1-Zellen i.v. injiziert. Der Kontrollgruppe wurden anstatt Th1-Zellen 100µl PBS i.v. injiziert. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es nach einer veränderten Expression von HO-1, induziert durch eine therapeutische Behandlung mit Co-PP, um HO-1 hochzuregulieren bzw.

mit Zn-PP, um HO-1 herunterzuregulieren, bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen zu physiologischen Veränderungen kommt. Hierzu erhielt die Verpaarungskombination BALB/c x C57BL/6 zusätzlich zu der i.v. Injektion von Th1-Zellen am Tag 10 und Tag 12, am Tag 10 der Schwangerschaft eine i.p. Injektion von 5 mg/kg Co-PP oder 40 mg/kg Zn-PP. Die Mäuse wurden am Tag 14 der Schwangerschaft getötet. Zur Kontrolle der physiologischen Symptome wurde bei den Mäusen alle zwei Tage der Blutdruck gemessen, wobei die Adaptation an das Blutdruckmessen 21 Tage vor der eigentlichen Schwangerschaft begann.



#### Zeitlicher Versuchsverlauf:

Adaptation an das Blutdruckmessen	Plug	Zellbehandlung/CoPP /ZnPP Injektion	Zellbehandlung	Sektion
-----------------------------------	------	-------------------------------------	----------------	---------

-21 Tage	Tag 0	Tag 10	Tag 12	Tag 14
----------	-------	--------	--------	--------

#### Blutdruckmessung am Tag

-21	-19	-17.....	-1	1	3	5	7	9	11	13	14
-----	-----	----------	----	---	---	---	---	---	----	----	----

#### 4.1.5 Präparation der Mäuse und Probengewinnung

Am 8ten oder 14ten Tag der Schwangerschaft wurden die weiblichen Mäuse durch Genickbruch getötet. Das Fell wurde sorgfältig desinfiziert und das Tier auf einer sterilen Arbeitsfläche fixiert, anschließend wurden Abdomen und Becken geöffnet. Den trächtigen Tieren entnahm man den bicornuale Uterus, welcher anschließend beiderseits der Länge nach aufgeschnitten wurde. Die Lage der gesunden Embryonen sowie die Lage der von der Mutter resorbierten Embryonen wurde dokumentiert. Die Resorptionen unterschieden sich im Vergleich zu den normalen Embryonen und Plazenten durch die wesentlich geringere Größe und das nekrotische, hämorrhagische Erscheinungsbild. Die Abortrate in der Mausschwangerschaft wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Abortrate} = \frac{\text{Anzahl Implantationen}}{\text{Anzahl Resorptionen}} \times 100$$

Der Uterus wurde geöffnet, die Plazenten und Embryonen sorgfältig voneinander getrennt und anschließend die Dezidua frei präpariert. Weiterhin entnahm man der Maus die Milz und die Nieren. Für die Protein- und RNA-Isolation und die Messung der Caspase-3 Aktivität wurden die Gewebe mit kaltem, sterilem PBS (pH 7,4) gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Für die immunhistologischen Analysen wurden die Plazenten und Nieren in 96% Alkohol aufgenommen. Die für die Lymphozytenisolierung bestimmte Dezidua wurde in kleine Stücke geschnitten und in 50 ml Falconröhrchen unter Zugabe von 5 ml HBSS („Hank’s balanced salt solution“, ohne  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. ohne  $\text{Mg}^{2+}$ -Salze) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die für die Lymphozytenisolierung bestimmte Milz wurde in sterilem FCS-RPMI-Medium aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung ebenfalls auf Eis gelagert.

#### 4.1.6 Blutdruckmessung

Der Blutdruck bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen wurde als physiologischer Kontrolle herangezogen.

Vor dem eigentlichen Beginn des Tierversuchs wurden die Mäuse 21 Tage lang auf den Ablauf der Blutdruckmessung hin konditioniert, wobei die Blutdruckmessung bei den weiblichen BALB/c Mäusen alle zwei Tage erfolgte.

Zur Blutdruckmessung wurden die Tiere auf einer warmen Platte (37°C) mit Hilfe eines Käfigs fixiert. Eine Blutdruckmanschette (17mm Ø) wurde an der Schwanzbasis angelegt, um den Blutdruck zu messen. Ein Pulssensor am Schwanz ermittelte die Herzfrequenz. Das Blutdruckmessgerät wurde so eingestellt, dass ein Blutdruck zwischen 60 mmHg bis 240 mmHg ermittelt werden konnte. Der Bereich der Herzfrequenzmessung lag zwischen 350 Bpm und 800 Bpm. Zwischen den einzelnen Messungen lag eine Ruhepause von 1 sec. Um die Messfehler durch Bewegungen der Maus zu minimieren, wurden je 10 Messungen durchgeführt, wobei der Durchschnitt dem systolischen Blutdruck der Maus entsprach.

#### **4.1.7 Lymphozytenisolierung aus der Dezidua**

Die bei der Sektion gewonnene Dezidua, welche in 5 ml HBSS aufgenommen und auf Eis gelagert wurde, wurde anschließend mit 1 mM DDT-HBSS-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und für 20 Minuten bei 37°C in einem Wannenbad inkubiert. Die Proben wurden während dieser Inkubation alle 5 Minuten geschüttelt. Der Überstand mit den aus der Dezidua gelösten Zellen wurde durch ein 100 µm Nylonnetz in ein neues Falconröhrchen pipettiert, welches daraufhin 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das leukozytäre Pellet in 1 ml FCS-RPMI-Lösung resuspendiert. Die Gewebstücke wurden in der Zwischenzeit wieder in 40 ml HBSS aufgenommen und abermals für 20 Minuten bei 37°C im Wannenbad inkubiert. Der Überstand wurde dann wieder durch ein 100 µm Nylonnetz auf das bereits vorhandene leukozytäre Pellet pipettiert, 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert und abermals in 1 ml FCS-RPMI Lösung aufgenommen. Dieser Arbeitsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Am Ende wurde das Zellpellet in 3 ml RPMI-Medium aufgenommen und nach Resuspendierung vorsichtig auf 5 ml FicoLite-M® geschichtet, welches sich in einem 15 ml Falconröhrchen befand. Anschließend erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation für 20 Minuten bei 2400 rpm, ohne Bremse und langsames Starten der Zentrifugation. Nach der Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen (v.a. Lymphozyten) vorsichtig mit einer Pasteurpipette aus der Interphase entfernt, mit RPMI gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml FCS-RPMI-Medium resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.1.8 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Die bei der Sektion gewonnene Milz wurde unter Zugabe von 5 ml RPMI-Medium und mit Hilfe eines Spitzenstempels durch ein 100 µm Nylonnetz gepresst und homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in den Vertiefungen einer 6-Well-Platte aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Suspension wurde dann mit Lysis-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 20 Minuten zur Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen, es folgte eine erneute Zentrifugation. Am Ende wurde das Pellet in 1 ml FCS-RPMI-Medium resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.1.9 Generierung von Th1-Zellen

Nicht schwangeren BALB/c Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen. Die gewonnene Milz wurde, unter Zugabe von 5 ml FCS-RPMI-Medium mit Hilfe eines Spitzenstempels durch ein 100 µm Nylonnetz gepresst und homogenisiert. Nach 10 Minuten zentrifugation bei 1500 rpm wurde das Pellet in 3ml FCS-RPMI-Medium aufgenommen und langsam auf 5 ml FicoLite-M® geschichtet, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die beiden Phasen nicht vermischten, um einen Dichtegradienten zu erhalten. Die mononuklearen Zellen wurden nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 4°C und 1500 rpm aus der Interphase entnommen, mit FCS-RPMI-Medium gewaschen und nochmals zentrifugiert (10 Minuten, bei 4°C und 1500 rpm). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI aufgenommen. Die polyclonale Aktivierung der Zellen erfolgte durch die Gabe von anti-CD3 (3µg/ml), wobei das Zellpellet für 20 Minuten mit dem Antikörper inkubiert wurde. Die Zellen wurden nach der Aktivierung mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in Kultur genommen. Das Kulturmedium enthielt HEPES (25 mmol/L), Glutamine (2 mmol/L), 10% Fötales Kälber Serum, Penicillin/Streptavidin, 1.022 ng rmIL-2 und 4 ng rmIL-12/mL. Die Zellen wurden 48 Stunden lang in Kultur gehalten und anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden die Zellen auf ihre Th1-Zytokinproduktion hin untersucht. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden  $3 \times 10^7$  Zellen in 100 µl aufgenommen und den Mäusen *i.v.* injiziert.

## 4.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie erfolgt die Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Die Durchflusszytometrie erlaubt es gleichzeitig mehrere physikalische und Fluoreszenz-Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen, wobei im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Farben verwendet wurden, um so die gleichzeitige Bestimmung von Zelloberflächenmarkern und intrazellulären Zytokinen zu ermöglichen. Der Durchflusszytometer misst, wie die Zellen das Licht absorbieren bzw. reflektieren und wie intensiv die Fluoreszenz der Zellen ist. Diese Daten werden in ein computergerechtes Signal umgewandelt und anschließend ausgewertet.

Nach der Isolierung der Lymphozyten aus der Deizidua und der Milz wurden diese auf Eis gelagerten Zellen in eine 12 Wellplatte überführt und 4 Stunden stimuliert. Zur Stimulierung wurden die Zellen in RPMI 1640 mit 10% FCS und Pen/Strep aufgenommen, welches zusätzlich mit 50 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin versetzt wurde. PMA stimuliert dabei durch eine Aktivierung der Proteinkinase C ein Triggern des T-Zell Rezeptors, während Ionomycin gleichzeitig für einen Calziumeinstrom in die T-Zelle sorgt. Dadurch wird eine maximale Aktivierung jeder T-Zelle bewirkt und deren Zytokinprogramm abgerufen. Die Akkumulation der Zytokine im Golgi Vesikel ermöglicht eine spätere Färbung mittels Antikörpern. Nach einer Stunde Inkubation wurde den Zellen zusätzlich noch 0,2 µM Monensin zugefügt. Monensin fungiert als Protein-Transport-Inhibitor, um die Zytokinsekretion der Zelle zu verringern und damit die intrazelluläre Zytokinkonzentration zu erhöhen. Nach der Inkubation erfolgte eine gleichmäßige Aufteilung der Zellen auf FACS-Röhrchen. Die Zellen wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die extrazellulär bindenden Antikörper CD4 (FITC-conjugiert), CD8 (Cy5-conjugiert) oder CD25 (PE-conjugiert) bzw. die Isotypkontrolle (PE-conjugiert) auf das Pellet pipettiert. Alle Antikörper wurden vorher mit FACS-Puffer auf 1:100 verdünnt. Nach der Resuspendierung des Zell-Pellets erfolgte eine Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 4° C. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 4° C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 100µl 1% Paraformaldehyd aufgenommen und über Nacht (ÜN) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (10 Minuten, 1500 rpm bei 4° C) und für 20 Minuten mit den intrazellulären Antikörpern IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α oder INF-γ (alle PE-conjugiert) inkubiert. Die



Antikörper wurden zuvor mit 0,1% Saponin auf 1:200 verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Saponin gewaschen und nochmals für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 100 ml FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte die Analyse der Zellen mit Hilfe des FACS-Caliburs.

## **4.3 Histochemie**

### **4.3.1 Paraffineinbettung von Gewebe**

Zur Fixierung der Plazenten und Nieren, die während der Sektion der Tiere gewonnen und in 96% Ethanol aufgenommen wurden, wurden diese in Plastikbehältnisse überführt, gekennzeichnet und anschließend für 1 ½ Stunden in 100% Ethanol bei 4°C dehydriert. Die Proben wurden dann in Xylol überführt und abermals bei 4°C für 1 ½ Stunden dehydriert. Anschließend erfolgte eine 1 ½-stündige Lagerung der Gewebe in Xylol bei Raumtemperatur (RT). Xylol diente hierbei als Intermedium, das den Alkohol verdrängt und sich anschließend mit dem Paraffin vermischt. Die Gewebeproben wurden dann für 1 ½ Stunden in flüssiges Paraffin eingelegt, gefolgt von der Einbettung der Gewebe. Die Gewebeproben wurden dazu in eine warme Metallschale gelegt und flüssiges Paraffin zugefügt. Die Metallschale wurde durch eine Plastikschele verschlossen und auf eine Metallplatte mit einer Temperatur von -30°C gestellt. Nach Abkühlung und Aushärtung des Paraffins entfernte man die Metallschale und säuberte die Proben von überschüssigen Paraffinresten. Diese Methode der Gewebefixierung wurde erstmals 1962 von Saint-Marie beschrieben.

### **4.3.2 Immunhistochemie (IHC)**

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Der primäre Antikörper bindet an das dazustellende Antigen. Um diese Bindung nachzuweisen, markiert man den ersten Antikörper mit einem biotinylierten sekundären Antikörper. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das F<sub>c</sub>-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. An den Sekundärantikörper wird durch eine Verbindung zwischen Biotin und Avidin ein Meerrettich-Peroxidase-Komplex (HRP, engl.: horseradish-peroxidase) angelagert. Zur Visualisierung des gesamten Antikörper-Komplexes werden verschiedene Chromogene verwendet (z.B. DAB oder AEC), die an die Peroxidase des HRP binden.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden auf eine Dicke von 5-7 µm zugeschnitten und auf einen Objektträger fixiert. Die Schnitte wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Vor der eigentlichen Färbung mussten die Schnitte deparaffinisiert werden. Dazu wurden die Schnitte zweimal 20 Minuten bei RT in Xylol gewaschen. Anschließend erfolgten weitere Waschschrte von je 10 Minuten in 100%, 96% und 75% Ethanol. Die Schnitte wurden abschließend 10 Minuten lang in Aqua dest. gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrte in TBS (10 Minuten) wurden die Gewebe für 20 Minuten mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu unterdrücken. Nach erneutem Waschen der Schnitte in TBS wurden diese dann für 20 Minuten mit BSA blockiert (10% BSA in PBS), um unspezifische Bindungen zu verhindern und somit eine Hintergrundfärbung zu vermeiden. Nach 10 Minuten Waschen in TBS wurden die Schnitte für 20 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Blocking Kit inkubiert, um weitere unspezifische Anlagerungen des Antikörpers an Biotin zu verhindern. Es folgte ein weiterer Waschschrte der Proben in TBS (10 min). Die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem ersten Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C ÜN. Der erste Antikörper wurde hierzu in 10% BSA verdünnt. Als erste Antikörper wurden HO-1 (1:100), HO-2 (1:500), iNOS (1:50) oder eNOS (1:25) verwendet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder 10 Minuten lang in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde mit dem 2. Antikörper, ein biotinilierter Ziege-Anti-Hase Antikörper, welcher in 10% BSA 1:200 für HO-1 und HO-2 und 1:100 für iNOS und eNOS verdünnt wurde. Nach 10 Minuten waschen in TBS wurden die Proben 30 Minuten lang mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (HRP) inkubiert und anschließend abermals in TBS gewaschen (10 Minuten). Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde für HO-1 und iNOS 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) verwendet und für HO-2 und eNOS Diaminobenzidin (DAB). Die Schnitte wurden jeweils 5 Minuten mit AEC oder DAB inkubiert und anschließend wieder in TBS gewaschen (10 Minuten). Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 2 Minuten mit Hämalaun inkubiert. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte, welche mit DAB gefärbt wurden, jeweils 10 Sekunden in 75%, 96% und 100% Ethanol und dann 5 Minuten in Xylol gewaschen, anschließend erfolgte die Versiegelung der Gewebsschnitte mit einem Kit von Roth (Roti<sup>®</sup>-HistoKit). Die Gewebeschnitte mit der AEC-Färbung wurden nach kurzem Waschen in Aqua dest. mit Ultramount Medium versiegelt. Als negative Kontrolle für die Färbung erfolgte eine Inkubation mit 10% BSA anstatt mit dem 1. Antikörper. Nach Aushärtung der Versiegelung erfolgte eine Analyse der Schnitte unter dem Lichtmikroskop, welche von 2 Begutachtern unabhängig voneinander erfolgte. Bei der Analyse der Schnitte wurden die verschiedenen Zelltypen der Plazenta und die Dezidua einzeln voneinander betrachtet und die Farbintensität

dieser Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der Farbintensität wurde eine Skala von 0-6 von dem Begutachter festgelegt, wobei 0 keine Färbung der Zellen bedeutet und 6 die stärkste vom Begutachter festgelegte Färbung. Die Beschriftung der Schnitte wurde während der Bestimmung der Farbintensität verdeckt, sodass die Schnitte erst nach der Auswertung einer Gruppe zugeordnet werden konnten.

#### **4.3.3 TUNEL (*Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*)**

Zur Bestimmung der Anzahl von apoptotischen Zellen in plazentalem Gewebe wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (4.3.1) auf eine Dicke von 5-7µm zugeschnitten. Die Entparaffinisierung erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben. Zur Färbung der apoptotischen Zellen wurde das *in situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche) verwendet. Damit der Farbstoff des POD-Kits in der Lage sein konnte in den Zellkern vorzudringen, wurden die Schnitte zur Permeabilisierung der Zellwände mit Zitratpuffer 2-mal 5 Minuten bei 360W in der Mikrowelle behandelt. Um den Puffer abzukühlen wurde langsam Aqua dest. hinzugefügt. Nach 10 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei RT inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen in PBS für je 5 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend für 30 Minuten bei RT mit 0,1M Tris-HCL (mit 3% BSA und 20% FCS) inkubiert. Nach weiterem Waschen für 2-mal 5 Minuten in PBS erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem TUNEL-Reagenz für eine Stunde bei RT. Die TUNEL-Reagenz wurde aus der Label-Solution und der Enzym-Solution hergestellt. Es folgte ein weiterer Waschschrift in PBS, um anschließend die Proben für 20 Minuten mit dem Converter-POD bei RT zu inkubieren. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 5 Minuten lang mit DAB inkubiert um die markierten 3' Enden zu färben. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in Aqua dest. gewaschen, um dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert zu werden (siehe 4.3.2). Die Gewebe wurden dann mit dem Roti-HistoKit versiegelt. Bei der Negativ-Kontrolle wurde bei der Herstellung des TUNEL-Reagenz nur die Label-Solution verwendet. Die Schnitte wurden nach Aushärtung der Versiegelung unter dem Lichtmikroskop von 2 unabhängigen Begutachtern untersucht. Mit Hilfe eines Augenstückes, in welches ein Mikrometer eingraviert war, wurde die Anzahl der positiven Zellen in dem Gewebe in 20 aneinander liegende 1mm x 1mm großen Quadraten bestimmt, wobei der Startpunkt der Bestimmung in dem Gewebe zufällig gewählt wurde und die Größe der Quadrate durch das Mikrometer festgelegt war. Am Ende wurde dann die Anzahl der positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> plazentalen Gewebes berechnet, wobei auch Quadrate mit einbezogen wurden, die keine apoptotischen Zellen aufwiesen.

#### 4.4 Real-Time RT-PCR

Bei der reversen Transkription (RT) wird zunächst mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hybridisieren kurze Oligonukleotide (Primer), die den interessierenden DNA- Abschnitt von beiden Seiten her begrenzen, mit den jeweils komplementären Basensträngen der cDNA. Eine hitzebeständige DNA- Polymerase ergänzt die fehlenden Stücke komplementär zur Vorlage. Am Ende der Reaktion liegen 2 identische DNA- Doppelstränge, die durch Hitze in ihre beiden Einzelstränge getrennt werden. Durch Wiederholungen des Zyklus wird somit das DNA- Molekül exponentiell amplifiziert. Bei der Real-time-PCR ist man in der Lage, mit Hilfe von Fluoreszenz den Verlauf der PCR zu verfolgen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um die Real-time PCR verfolgen zu können. Zum einen wurde die TaqMan™-PCR durchgeführt und zum anderen erfolgte die PCR mittels SYBR-Green. Bei der TaqMan™-PCR wurde zusätzlich zu den zwei cDNA-Primern eine cDNA-Sonde eingesetzt, die an einem Ende mit dem Quencher, am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert sind. Die Sonden binden spezifisch an einen Teil des zu detektierenden DNA-Abschnittes zwischen den beiden Primern. Die Taq-Polymerase baut während der Synthese des Gegenstranges die Sonde ab, wodurch der Quencher und das Fluorophor voneinander getrennt werden und eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann. Mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems werden die Fluoreszenzänderungen von Zyklus zu Zyklus in Echtzeit erfasst. Je höher die Anfangskopienzahl der cDNA einer Probe ist, umso schneller steigt die Fluoreszenzintensität an. Beim SYBER-Green lagert sich der Fluoreszenzfarbstoffe direkt in die DNA ein bzw. bindet sich an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

##### 4.4.1 RNA-Isolierung aus Plazenta-, Dezidua- und Nierengewebe

Die bei der Sektion gewonnenen Gewebe (Plazenta, Dezidua und Niere) wurden jeweils mit 1 ml TRIZOL-Reagenz versetzt, mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert und auf Eis gelagert. Dem homogenisierten Gewebe wurde anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und danach für 2 Minuten bei RT gevortext. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm kam es zur Bildung von drei Phasen: Einer Phenol-Chloroform-Phase, einer DNA- und Protein-Interphase sowie einer RNA-enthaltenden Phase. Die obere Phase, welche die

RNA enthielt, wurde in neues Eppendorfgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropylalkohol versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 10000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Am Ende wurde das Pellet luftgetrocknet, in RNase-freiem Wasser gelöst und mit einer Konzentration von 1µg/µl bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation aus den Geweben wurde auf Eis durchgeführt und unter Beachtung von RNase-Freiheit gearbeitet.

#### 4.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA in RNase-freiem Wasser 1:1000 verdünnt und in einer 1 ml-Quarzküvette ein Absorptionsbereich von  $\lambda = 200-300$  nm gemessen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Auskunft über eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäuren und sollte zwischen 1,7-2,1 liegen. Die Konzentration der Ausgangslösung in µg/ml wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration} = 40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor in der Küvette} \times \text{spezifische Konzentration in } \mu\text{g/ml Lösungsmittel}$$

Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde eine Agarose-Gelchromatographie durchgeführt. Auf ein 1,5% Agarosegel wurde 1µg RNA aufgetragen, und die Elektrophorese für 1 Stunde bei 180V durchgeführt. Den einzelnen Proben wurde Ethidiumbromid hinzugefügt, um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen (Abb.7). Bei einer hochwertigen Qualität der RNA sollten ausschließlich die 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA erkennbar sein. Bei einer schlechten Isolation kann man die hochmolekulare DNA obere Bande beobachten.

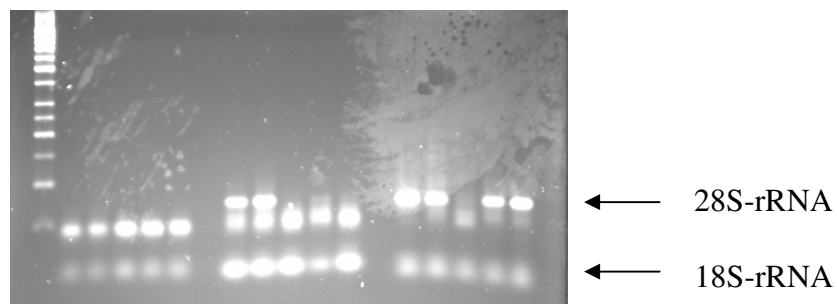


Abbildung 7: Agarosegel zur Kontrolle der RNA-Qualität. Die obere entspricht der 28S- und die untere Bande der 18S- ribosomalen RNA

#### 4.4.3 Reverse Transkription

Die RNA-Proben werden mittels der *reversen Transkriptase* (Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase, MMLV-RT) in cDNA umgeschrieben.

2 µl RNA-Lösung (1 µg/µl) wurden hierzu auf 18 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und 2 µl oligo-dThymidin-Ribonukleotide (odT) zugefügt. Die Probe wurde gevortext, kurz abzentrifugiert, für 10 Minuten bei 75°C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden der Probe 8 µl MMLV-RT-Puffer, 4 µl Aqua ad inject., 4 µl dNTPs [2,5 mM], 2 µl DNase [2u/µl] und 0,5 µl RNase-Inhibitor [40 u/µl]) zugegeben und die Probe für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNase verdaut eventuell vorhandene gen. DNA. Zur Inaktivierung der DNase wurde anschließend die Probe für 5 Minuten auf 75°C erhitzt und danach für 2 Minuten auf Eis abgekühlt.

Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte durch die Gabe von 1 µl MMLV-Reverse-Transkriptase [200u/µl] und 1 µl RNase-Inhibitor [40 u/µl]) und der Inkubation bei 42°C für 60 Minuten. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde die Probe für 5 Minuten auf 94°C erhitzt. Die cDNA-Proben wurden anschließend bei -35°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 4.4.4 Real-Time RT-PCR mit Sonde

cDNA-Proben von Plazenta, Dezidua und Niere wurden mittels Real-Time RT-PCR auf folgende Gene hin untersucht: HO-1, TNF-α und TGF-β, als *house keeping genes* wurde β-Actin verwendet.

Für die Real-Time RT-PCR wurden 2µl (für HO-1, TNF-α und TGF-β) cDNA zur Amplifikation verwendet. Zu der cDNA wurde ein Mastermix aus 6,5 µl PCR-Mastermix, 3 µl Primermix (Vorwärts- und Rückwärtsprimer Tab.1), 0,5 µl Sonde (Tab.1) und 2 µl sterilem Wasser gegeben. Für die *no template control* (NTC) wurde anstatt cDNA Wasser verwendet. Die Amplifikationsreaktion an dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System lief wie folgt ab:

2 Minuten Inkubation bei 50°C, gefolgt von einem erstmaligen Denaturierungsschritt der DNA bei 90°C für 10 min, anschließend folgten 40 Amplifikationszyklen (je 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C).

Bei allen Amplifikationsreaktionen wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt.

HO-1 Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer Sonde	5'- CAG AAG AGG CTA AGA CCG CCT T -3' 5'- TCT GGT CTT TGT GTT CCT CTG TCA -3' 5'- TGC TCA ACA TTG AGC TGT TTG AGG AGC TG -3'
iNOS Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer	5'- CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT-3' 5'- TGA ATG TGA TGT TTG CTT CGG-3'
eNOS Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer	5'- GCT GGA TGA AGC CGG TGA -3' 5'- CGA AAA TGT CCT CGT GGT AGC -3'
TGF- $\beta$ Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer Sonde	5'-GGC TAC CAT GCC AAC TTC TGT CT-3' 5'-CCG GGT TGT GTT GGT TGT AGA-3' 5'-CAC ACA GTA CAG CAA GGT CCT TGC CCT-3'
TNF- $\alpha$ Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer Sonde	5'-TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC-3' 5'-CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC-3' 5'-CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGC GGA-3'
$\beta$ -Actin Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer Sonde	5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT T-3' 5'-GTT GTC GAC GAC CAG CGC-3' 5'-CAF CCT TCC TTC TTG GGT ATG GAA TCC T-3'

Tabelle II: Sequenzen der Primer und Sonden, die bei der Real-Time RT-PCR verwendet wurden. Alle verwendeten Sonden waren mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM gelabelt.

Für die Auswertung der Real-Time RT-PCR wurde zuerst das zu untersuchende Gen in Relation auf das *house keeping gene* bezogen. Bei *house keeping genes* handelt es sich um Gene, die in jedem Gewebe in gleichem Maße exprimiert werden. Als *house keeping gene* wurde im Rahmen der Arbeit das  $\beta$ -Actin-Gen verwendet, was, außer während der Zellproliferation, in seiner Expression weitgehend konstant ist.

Die relative Quantifizierung erfolgt durch die Berechnung des  $\Delta C_T$

1.) Bildung des  $\Delta C_T$ -Wertes:

$$\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T (\text{Zielsequenz}) - \text{Mittelwert } C_T (\text{house keeping gene})$$

Um den  $\Delta C_T$  in Relation mit der Effizienz der PCR zu setzen, wurde zur Kontrolle eine Standardkurve der PCR ermittelt. Die Steigung der Standardkurve zeigte, dass die Effizienz der PCR bei 100 Prozent liegt und somit von einer Verdopplung der Kopienzahl von Zyklus zu Zyklus ausgegangen werden kann.

Damit kann das Ergebnis der RT-PCR als  $2^{-\Delta C_T}$  dargestellt werden.

#### 4.4.5 Real-Time RT-PCR mit SYBR Green

cDNA-Proben von Plazenta, Dezidua und Niere wurden mittels Real-Time RT-PCR mit SYBR Green auf folgende Gene hin untersucht: eNOS, iNOS als *house keeping genes* wurde  $\beta$ -Actin verwendet.

Ein Mastermix aus 6,5  $\mu$ l SYBR-Green-Mastermix, 3  $\mu$ l Primermix (Vorwärts- und Rückwärtsprimer Tab.1), 5  $\mu$ l 25 nM Fluorescein und 2  $\mu$ l sterilem Wasser wurde zu 1  $\mu$ l cDNA gegeben. Die Amplifikationsreaktion wurde am i-Cycler durchgeführt und sah wie folgt aus:

3 Minuten Inkubation bei 95°C, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen (30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 60°C und 30 Sekunden bei 72°C) und anschließend 1 Minute bei 95°C. In der Regel wurde danach eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt; sie hatte folgendes Thermoprofil: 1 Minute bei 50°C und anschließend 80 Zyklen á 10 Sekunden mit einer stufenweisen Temperatursteigerung von 0,5°C pro Zyklus. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann nach erfolgter PCR zwischen dem Zielprodukt und unspezifischer DNA differenziert werden. Bei allen Amplifikationsreaktionen wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie unter 4.4.4 beschrieben.

#### 4.4.6 Primeretablierung für eNOS und iNOS

Zur Optimierung der Transkription muss daher das beste Verhältnis des *forward* und *reverse* Primers durch Titration bestimmt werden.

Die Titration der Primer erfolgte mittels einer Real-Time PCR. Den Proben wurde 6,5  $\mu$ l SYBR-Green-Mastermix, 0,5  $\mu$ l 25 nM Fluorescein, 2  $\mu$ l steriles Wasser und 1  $\mu$ l cDNA (bzw. 1  $\mu$ l steriles Wasser bei der negativ Kontrolle) hinzugefügt. Anschließend wurde 3  $\mu$ l Primermix in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen dazugegeben. Folgende Konzentrationsverhältnisse in nmol/l wurden verwendet: 50/50, 50/300, 50/900, 300/50, 300/300, 300/900, 900/50, 900/300, 900/900 (Vorwärts-/Rückwärtsprimer). Alle anderen Primer waren bereits am Institut etabliert bzw. wurden von meinen Arbeitskollegen etabliert. Die Auswahl der bestmöglichen Primerkombination erfolgte dann durch Auswertung der  $C_T$ -Werte und die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse.

Zusätzlich wurde eine Titration mit cDNA und eine Titration zur Beurteilung der Primerdimer-Bildung nur für die NTCs (*no template control*) durchführt, um eine Bildung von Primerdimeren zu minimieren. Primerdimere bilden sich entweder, wenn die zu



untersuchende cDNA nur sehr geringe Mengen des Zielgens enthält oder wenn Vorwärts- und Rückwärtsprimer eine zu große Komplementarität aufweisen.

## **4.5 Proteinanalysen**

### **4.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes**

Zur Herstellung eines Proteinextraktes wurden die bei der Sektion gewonnen Gewebe von Plazenta und Dezidua in 100 µl Lysis-Puffer (PBS, pH 7,4 + 0,1% Triton X 100, 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 100 mM Benzamidin, 100 mM E-Aminocapronsäure und 100mM EDTA) aufgenommen. Um ein feines Homogenisat zu erhalten, wurde die Suspension anschließend in weiteren 200-400 µl Lysis-Puffer aufgenommen und auf Eis mit einem Hand-Homogenisator weiter aufgeschlossen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Der BCA-Test wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen. Der Test verwendet folgende Konzentrationen von BSA (1, 0,5, 0,25, 0,01, 0,005, 0,0025, 0,001 mg/ml) als Standard, um die gesuchte Proteinkonzentration zu ermitteln. In eine 96er Mikrotiterplatte wurden je Well 10µl der zu bestimmenden Probe oder BSA-Standard pipettiert, wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Anschließend wurden 200 µl Bio-Rad Protein Assay, welche vorher im Verhältnis 5:1 mit Aqua dest. verdünnt wurde, hinzugefügt. Die folgende Farbreaktion wurde über eine OD von 570nm in einem Spektralphotometer bestimmt.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben wurde anhand der Messwerte des BSA-Standards eine Eichkurve erstellt, mittels derer die unbekannten Konzentrationen der Proteine bestimmt werden konnten.

### **4.5.3 Auftrennung von Proteinen durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Trennung einzelner Proteine erfolgte nach ihrem Molekulargewicht in einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Gel). Jede Probe wurde mit

zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt, wobei das Verhältnis von Probe zu Probenpuffer 2:1 betrug, für 5 Minuten bei 95°C gekocht und dann kurz bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein Rainbow-Marker als Molekulargewichtsstandard verwendet. Das Gel setzte sich aus einem 4%igem Sammelgel und einem sich anschließenden 12%igem Trenngel bei HO-1, HO-2 und einem 6%igem Trenngel bei iNOS und eNOS zusammen. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 100V angelegt. Anschließend an die Elektrophorese erfolgte die Weiterverarbeitung des Gels für den Western-Blot an (siehe 4.5.4).

#### **4.5.4 Western-Blot**

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in Proteingemischen. Dabei werden einzelne Proteine aus Gewebe-Lysaten der Plazenta und der Dezidua nachgewiesen. Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. An den gebundenen ersten Antikörper wird ein zweiter Antikörper angelagert, welcher biotinyliert ist. Durch eine enzymatische Reaktion zwischen Biotin und Avidin wird an den zweiten Antikörper ein HRP-Komplex gebunden, welcher mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Zur Visualisierung des gesamten Antikörper-HRP-Komplexes wird das ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (Kit) verwendet. Durch eine Reaktion des ECLs mit der Peroxidase wird Fluoreszenz freigesetzt, welche mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird.

Der spezifische Proteinnachweis der im Proteinextrakt enthaltenen Proteine HO-1, HO-2, iNOS, eNOS erfolgte durch Western-Blot mittels Protein-spezifischer Antikörper. Die Proteine wurden dazu im Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45µm) übertragen. Hierzu wurde das Gel der SDS-PAGE auf die Membran gelegt, wobei die Membran durch den Transferpuffer angefeuchtet war. Ober- und unterhalb des Gels und der Membran wurden zwei Lagen Whatmanpapier und je ein Schwammgewebe gelegt, welche ebenfalls bereits mit dem Transferpuffer befeuchtet waren und mittels einer Klammer zusammengedrückt. Es wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran eingeschlossen wurden. Anschließend wurde die Klammer in der Transferrkammer befestigt. Das Gel zeigte zum negativen Pol, die Nitrozellulosemembran zum positiven Pol. Der Transfer von Proteinen erfolgte aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran bei einer Stromstärke von 10V ÜN.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS-Puffer (5% Milchpulver) inkubiert, um freie Proteinbindestellen abzublocken. Es folgte

die Inkubation mit dem ersten Antikörper HO-2, eNOS, iNOS (1:5000), HO-1 (1:1000) für zwei Stunden bei RT auf einem Schwenktisch. Die Antikörper wurden in TBS mit 5% Milchpulver verdünnt. Der spezifische Antikörper bindet das zu detektierende Protein. Der restliche freie Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS (5% Milchpulver) entfernt. Der zweite biotinierte Antikörper Ziege-Anti-Hase wurde mit TBS (5% Milchpulver) auf 1:5000 verdünnt und anschließend für 2 Stunden unter ständiger Bewegung inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Nach 2-maligem Waschen in PBS (0,1% Tween 20) wurde die Membran mit dem HRP für 30 Minuten bei RT inkubiert. Zur Visualisierung der positiven Banden wurde das ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (Kit) verwendet. Nach Mischen der beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:1 wurde die Membran 1 Minute im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Belichtung eines Röntgenfilms in einer Dunkelkammer durch Inkubation mit der Membran für 30 Sekunden-2 Minuten. Der Röntgenfilm wurde dann automatisch durch die Compact<sub>2</sub> Röntgenfilmentwicklungsmaschine entwickelt. Die Dichte der Banden wurde mit Hilfe des Imagequant TL Programms (Amersham) ausgewertet. Hierzu wurden die Membranen eingescannt (Abb.8), anschließend legte man mit Hilfe des Computerprogramms die einzelnen positiven Banden fest, die das Programm analysieren sollte. Das Programm ermittelte dann die Dichte der einzelnen Banden. Anschließend wurde die Ratio aus der Dichte der Banden von HO-1, HO-2, iNOS und eNOS gegen die Dichte von beta-actin berechnet.

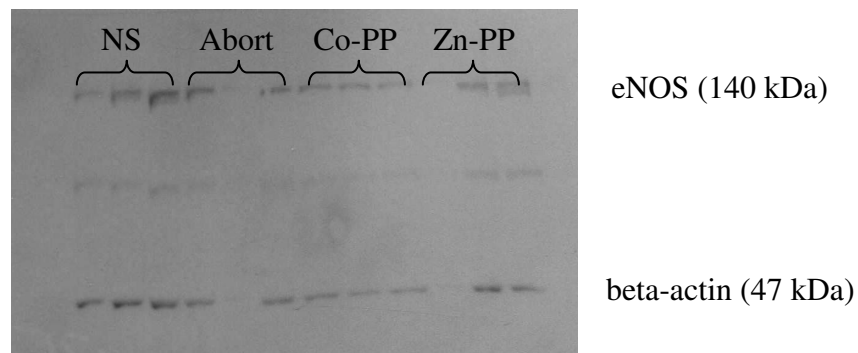


Abbildung 8: Beispieleröntgenbild eines Western-Blots. Die oberen Banden zeigen den positiven Nachweis an eNOS in je 3 Proteinproben der normalen Schwangerschaftsgruppe (NS), der Kontrollabortgruppe (Abort), der Abortgruppe die mit Co-PP behandelt wurde und der Abortgruppe die mit Zn-PP. Die unteren Banden zeigen den positiven Nachweis an beta-actin in diesen Proteinproben.

## 4.6 Statistik

Alle statistischen Berechnungen und Darstellungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“, Version 11.5) oder mit Microsoft Excel 2003 durchgeführt.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte entweder mittels Box-Plots (Abb. 9), bei dem der Median sowie das obere und untere Quartil und Extremwerte dargestellt werden oder mittels einer Liniengraphik, bei dem der Median dargestellt ist.

Zur statistischen Erhebung der Daten wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test, bei dem die Signifikanz zwischen allen Gruppen berechnet wurde, und der Mann-Whitney-*U*-Test, bei dem die Gruppen paarweise mit einander verglichen wurden, angewandt. Als Signifikant wurde  $p \leq 0,05$  angesehen, wobei \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Bei gepoolten Proben wurde der Chi –Quadrat Test angewandt.

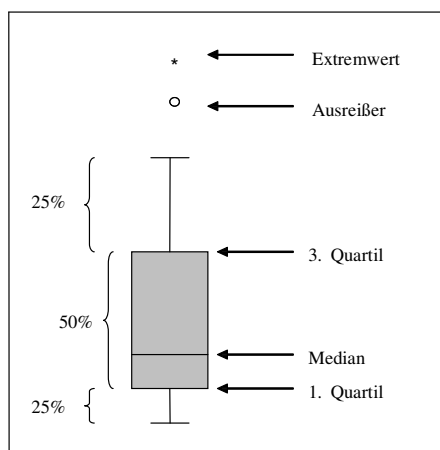


Abbildung 9: Schematische Box –Plot -Darstellung

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Untersuchungen von HO-1 in einem Mausmodell für spontanen Abort**

Das erste Ziel der Arbeit war es, die plazentale und deziduale Expression von HO-1 und HO-2 in Abortmäusen im Vergleich mit normal-schwangeren Mäusen zu bestimmen und eine mögliche Interaktionen zwischen HO, NOS und Zytokinen zu untersuchen. Um die Expression der HO untersuchen zu können, wurde auf das Mausmodell für spontanen Abort, welches von Clark (1980) erstmals beschrieben wurde, zurückgegriffen.

#### **5.1.1 Abortraten von normal-schwangeren Mäusen im Vergleich zum Mausmodell für Fehlgeburt**

Bei der Präparation der Mäuse am Tag 14 der Schwangerschaft, wurde die genaue Anzahl der Implantationen festgehalten. Zu den Implantationen gehören sowohl die gesunden Embryonen als auch die Resorptionen.

Bei der Verpaarung von weiblichen CBA/J Mäusen mit männlichen DBA/2J konnte am Tag 14 der Schwangerschaft im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Abortrate beobachtet werden (Abb.10A). Bei der Kontrollgruppe wurden weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen BALB/c verpaart. Bei der normalen Schwangerschaft (NS) lag der Median der Abortrate um 0%. Bei der Verpaarungskombination für einen spontanen Abort (Abb. 10A) lag die Abortrate um 20%. Die beobachteten Abortraten werden durch die Literatur bestätigt (Clark 1980, Chaouat 1988). Die Anzahl der Implantationen beider Gruppen waren vergleichbar (Abb. 10B).

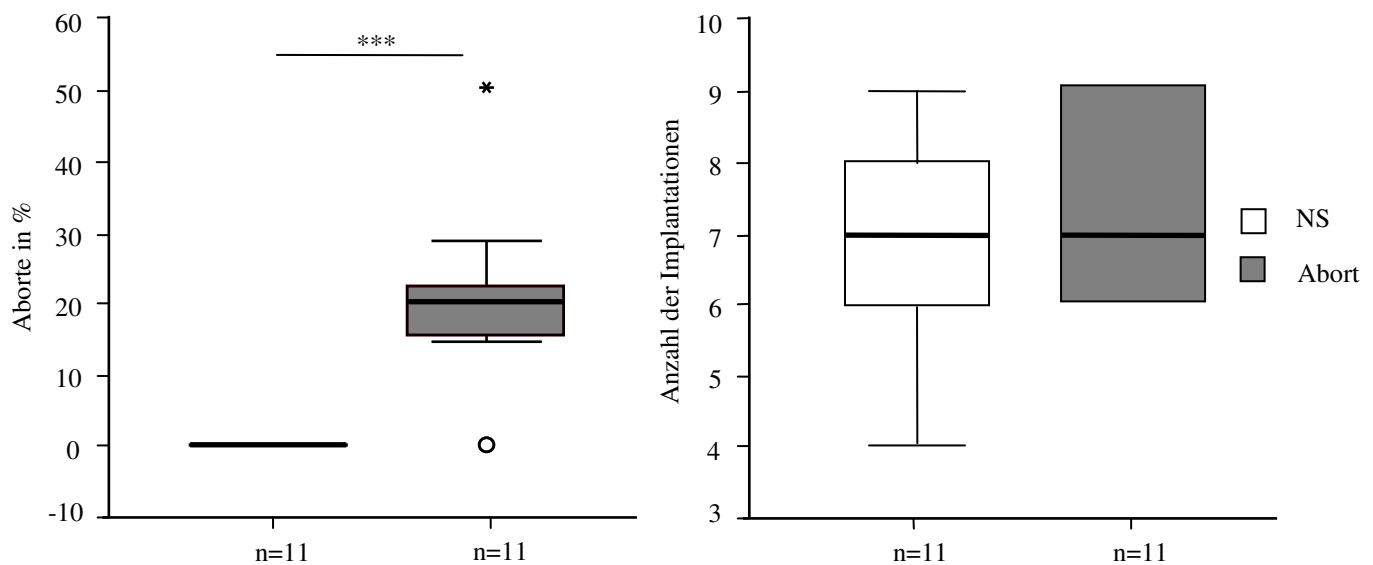


Abbildung 10: Die Daten werden als Box plots (Mediane) dargestellt. A) Gezeigt wird die Abortrate in %, wobei die Abortmäuse eine signifikante Erhöhung der Abortrate im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufweisen \*\*\* =  $p < 0,001$ , welches durch den Mann-Whitney-U Test ermittelt wurde. B) Zu sehen ist die Anzahl aller Implantationen der Abortgruppe im Vergleich zu der normalen Schwangerschaftsgruppe.

## 5.1.2 HO-1 und HO-2 Expression im Mausmodell für spontanen Abort

### 5.1.2.1 Immunhistochemische Analyse der Plazenta

Zur Untersuchung der HO-1 und HO-2 Expression in den unterschiedlichen Plazenta-Zelltypen wurden 5-7  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte der Plazenta angefertigt. Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase und möglicher unspezifischer Bindungen, die die HO-1 und HO-2 Antikörper eingehen könnten, wurde die Plazenta mit dem jeweiligen Antikörper für HO-1 oder HO-2, gefolgt von einem 2.Ak, inkubiert und die gebundenen Antikörper mittels Chromogenen sichtbar gemacht.

Die Auswertung der Expression von HO-1 und HO-2 erfolgte semi-quantitativ durch Bestimmung der Farbtintensität der einzelnen Zelltypen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass in allen Zelltypen der Plazenta HO-1 und HO-2 exprimiert werden (Tab.III, repräsentative Bilder in Abb.11). Bei dem Vergleich der Expression zwischen den Abortmäusen und den Mäusen der Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass bei den Tieren der Abortgruppe in allen Zelltypen der Plazenta, die Expression von HO-1 und HO-2 signifikant herabreguliert war (Tab.III, Abb.11). In der Dezidua konnte keine veränderte Expression zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.

<b>HO-1</b>	<b>NS (n=6)</b>	<b>Abort (n=6)</b>
Dezidua	0,50	1,25
Riesenzellen	4,00	1,75**
Spongiotrophoblasten	3,50	2,00**
Labyrinthzellen	3,25	2,50*
<b>HO-2</b>		
Dezidua	1,25	1,00
Riesenzellen	3,00	3,25*
Spongiotrophoblasten	3,00	1,50*
Labyrinthzellen	1,25	1,50*

Tabelle III: HO-1 und HO-2 Expression in verschiedenen Zelltypen der Plazenta und der Dezidua in Abortmäusen (A) im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe (NS), dargestellt als Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten werden als Mediane gezeigt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-*U* Tests ermittelt (\*: $p < 0,05$  und \*\*: $p < 0,01$ ).

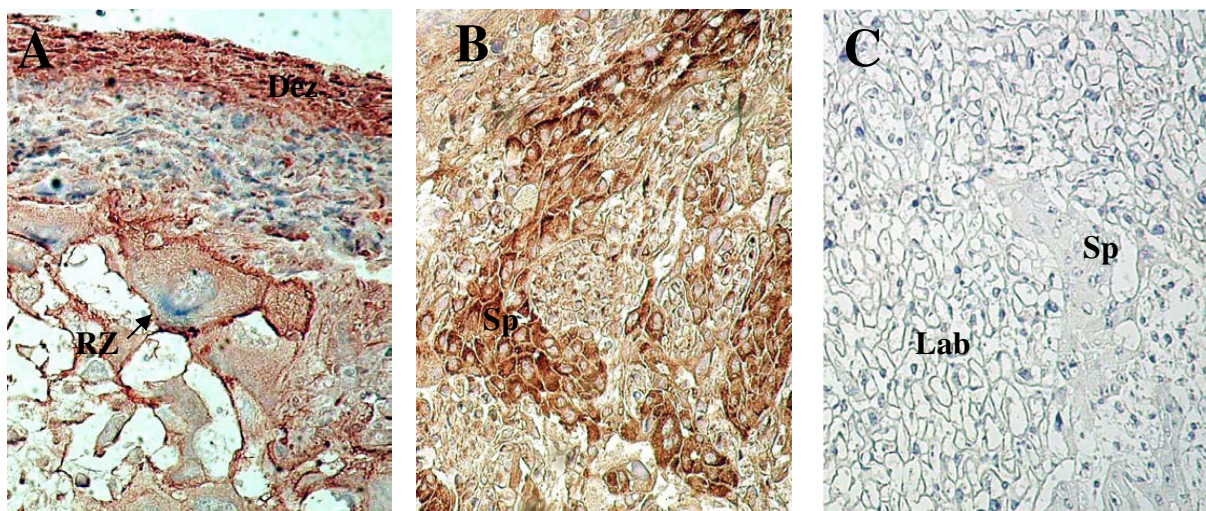


Abbildung 11: Repräsentative IHC-Bilder der Plazenta. Um HO-1 und HO-2 optisch auch von einander zu unterscheiden, wurden verschiedene Chromogene zur Visualisierung verwendet A) HO-1 positive Zellen an der Feto-maternalen Grenze. Der Pfeil markiert eine Riesenzelle (Rz), welche sich durch ihre starke Expression von HO-1 auszeichnet, weiterhin können HO-1+ Deziduazellen (Dez) beobachtet werden. (AEC-Färbung, rötliche Färbung) B) HO-2 positive Spongiotrophoblasten (Sp) zwischen negativen Glykogenzellen (DAB-Färbung, bräunliche Färbung) C) Negativ Kontrolle bei der kein erster Antikörper verwendet wurde.

### 5.1.2.2 Untersuchung der HO-1 und HO-2 Expression mittels Western-Blot

Zur semi-quantitativen Analyse der HO-1 und HO-2 Expression in der Plazenta wurde aus dieser ein Proteinextrakt gewonnen. 10 µg des Proteinextraktes wurde dann mittels einer SDS Page der Molekulargröße nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit Hilfe von spezifischen HO-1 und HO-2 Antikörpern konnte nun die Intensität der Banden von HO-1 und HO-2 bestimmt werden. Hierzu wurden die spezifischen Banden der Antikörper mit Hilfe von Chemilumineszens auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Positive Banden für HO-1 (33kDa) und HO-2 (36 kDa) konnten sowohl in den normal-schwangeren Mäusen wie auch in Mäusen der Abortgruppe beobachtet werden. Bei der Analyse der Intensität der Banden konnte gezeigt werden, dass in den Abortmäusen die

Intensität der Banden signifikant reduziert ist, im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 12A und B)

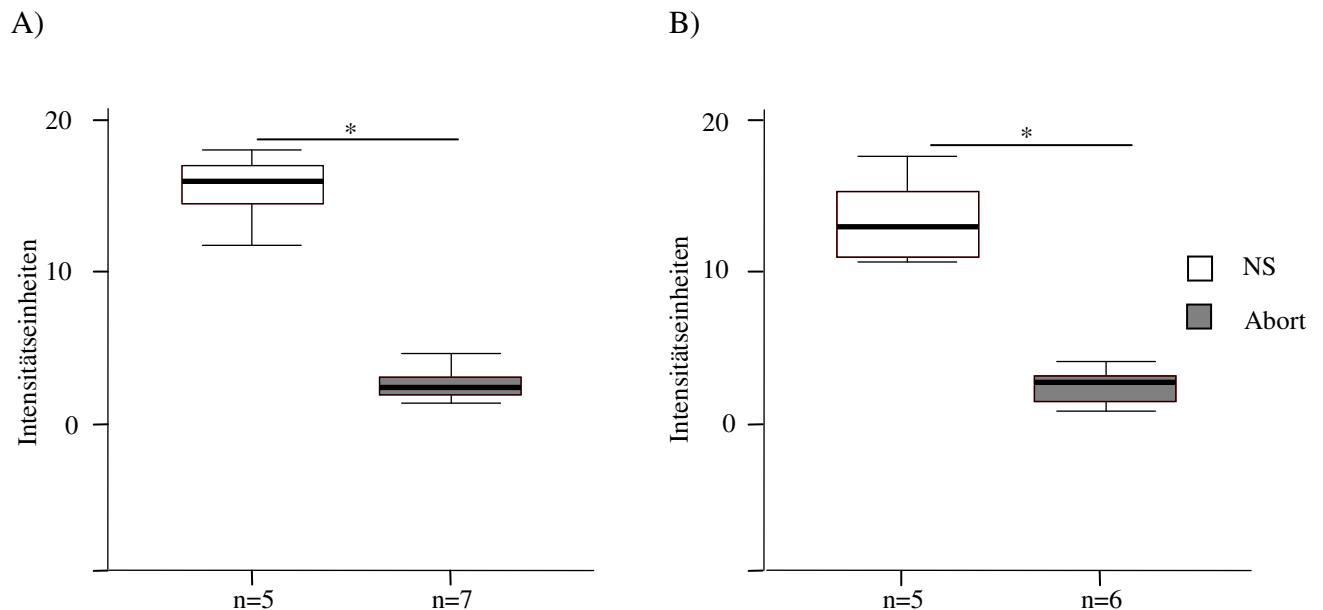


Abbildung 12: zeigt die positiven Western-Blot Banden als Box plots (Mediane) A) HO-1 und B) HO-2, wobei jeweils links die positiven Banden aus der Analyse des Homogenisat normal-schwangerer Mäuse zu sehen sind und jeweils rechts die positiven Banden aus dem Homogenisat der Abortmäuse. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Imagequant TL Programm) bestimmt und anschließend mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests (\*:p<0,05) miteinander verglichen.

### 5.1.3 Die Th1 und Th2 Zytokin-Produktion beim murinen spontanen Abort

Die aus der Milz und der Dezidua isolierten Lymphozyten wurden nach der Stimulation mit Ionomycin und PMA mit spezifischen Zytokin-Antikörpern markiert und anschließend im Durchflusszytometer auf die Menge der verschiedenen Zytokine und nach ihren *Cluster of Differentiation* (CD) hin untersucht. Bei der Analyse der Zytokine konnten sowohl in der Dezidua als auch in der Milz keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen der Abortgruppe und der normalen Schwangerschaftsgruppe beobachtet werden (Tabelle IV). Die Daten zeigen jedoch, dass sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen für die Produktion der Zytokine verantwortlich sind, da bei beiden Gruppen eine ähnliche Anzahl gemessen wurde. In der Milz konnten keine Unterschiede in der Th1/Th2 Ratio zwischen der Abortgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. In den Deziduazellen von Abortmäusen hingegen konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei den Tieren der Abortgruppe konnte auch eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ /IL-4 Ratio festgestellt werden, welche jedoch nicht signifikant war.



<i>Milz</i>	<i>Normale Schwangerschaft (n=10)</i>	<i>Abort (n=11)</i>
<b>Zytokine</b>		
TNF- $\alpha$	1,36	1,08
IFN- $\gamma$	0,53	0,67
IL-10	0,95	0,87
IL-4	1,13	0,77
TNF- $\alpha$ / IL-10	1,43	1,61
IFN- $\gamma$ /IL-4	0,46	0,87
<b>CD-Marker</b>		
CD4	10,12	8,36
CD8	9,97	7,57
CD25	1,99	1,54
CD4/CD25	1,09	0,87
<b>Dezidua</b>		
<b>Zytokine</b>		
TNF- $\alpha$	2,12	4,24
IFN- $\gamma$	2,92	3,28
IL-10	2,28	2,52
IL-4	1,05	1,61
TNF- $\alpha$ / IL-10	1,20	3,13*
IFN- $\gamma$ /IL-4	2,00	2,60
<b>CD-Marker</b>		
CD4	2,63	2,74
CD8	4,81	4,67
CD25	2,62	4,44
CD4/CD25	2,95	5, 53

Tabelle IV: Th1/Th2 Zytokine Produktion in Abortmäusen (A) im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe (NS). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der positiven Zellen als Mediane. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des MannWhitney-U Tests (\*:  $p < 0,05$ ) ermittelt

#### 5.1.4 iNOS und eNOS Expression im Mausmodell für spontanen Abort

##### 5.1.4.1 Immunhistochemische Analyse der Plazenta

Um die Expression von iNOS und eNOS in den verschiedenen Zellen der Plazenta und der Dezidua zu untersuchen, wurde iNOS und eNOS in Gewebeschnitte der Plazenta mittels spezifischer Antikörper markiert und sichtbar gemacht (Abb.13). Die Analyse der Schnitte zeigte bei beiden Isoformen von NOS nur eine sehr geringe Färbung der Zellen (Tab. V), was auf sehr geringe Mengen von NOS in der Plazenta hindeutet. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden (Tab. V).

<i>iNOS</i>	<i>NS (n=6)</i>	<i>Abort (n=6)</i>
Dezidua	0,25	0,00
Riesenzellen	1,75	2,00
Spongiotrophoblasten	1,25	1,00
Labyrinthzellen	1,00	0,50
<b>eNOS</b>		
Dezidua	0,50	0,50
Riesenzellen	3,50	1,50
Spongiotrophoblasten	1,00	1,00
Labyrinthzellen	1,00	1,50

Tabelle V: iNOS und eNOS Expression in verschiedenen Zelltypen der Plazenta und der Dezidua in Abortmäusen (A) im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe (NS), dargestellt als Median der Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten selbst werden als Median gezeigt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-*U* Tests ermittelt.

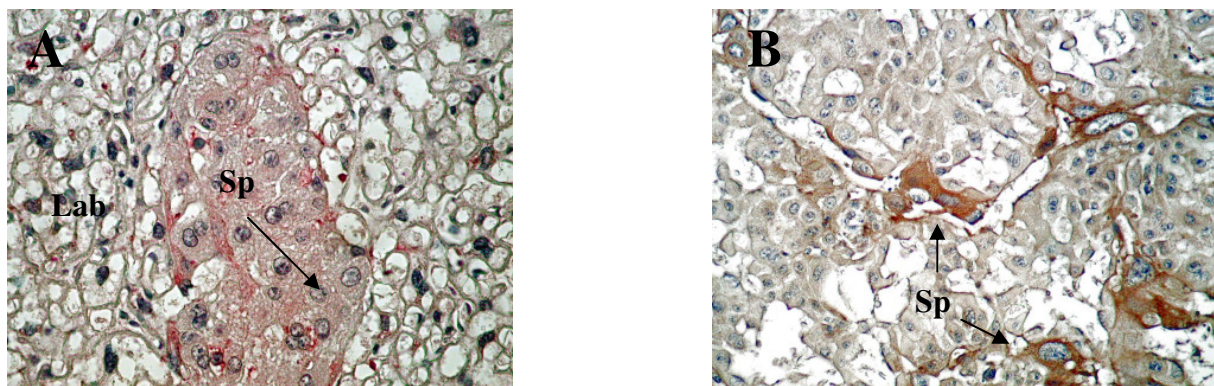


Abbildung 13: Repräsentative IHC-Bilder der Zelltypen der Plazenta. A) Labyrinthgewebe (Lab) und Spongiotrophoblasten (Sp) welche eine typische iNOS positive Färbung zeigt (AEC Färbung) B) einige eNOS+ gefärbte Spongiotrophoblasten (DAB Färbung). Die Pfeile markieren die positiv gefärbten Zellen.

#### 5.1.4.2 Western-Blot Analyse von iNOS und eNOS

Zur Analyse der iNOS und eNOS Expression in der Plazenta wurde aus der Plazenta ein Gesamtproteinextrakt gewonnen, welches auf eine SDS Page aufgetragen wurde. Nach Trennung der Moleküle wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern für iNOS und eNOS, gefolgt von einer Inkubation mit dem zweiten Antikörper und einer anschließenden Inkubation mit einem ECL-Kit, welches die Banden von iNOS und eNOS mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar macht, konnte die Stärke der Banden und somit die Menge von iNOS oder eNOS in der Plazenta bestimmt werden.

In der Plazenta von normal-schwangeren Mäusen, wie auch in der Plazenta von Abortmäusen konnte iNOS (130kD) und eNOS (140kD) nachgewiesen werden (Abb.14). Die Intensität der Banden waren insgesamt sehr schwach, was bedeuten würde, dass nur sehr geringe Mengen von iNOS und eNOS in der Plazenta vorhanden sind. Die Analyse der Banden zeigte, dass die

Expression von iNOS und eNOS in der Plazenta von Abortmäusen signifikant reduziert war, im Vergleich zu normal-schwangeren Mäusen (Abb.14).

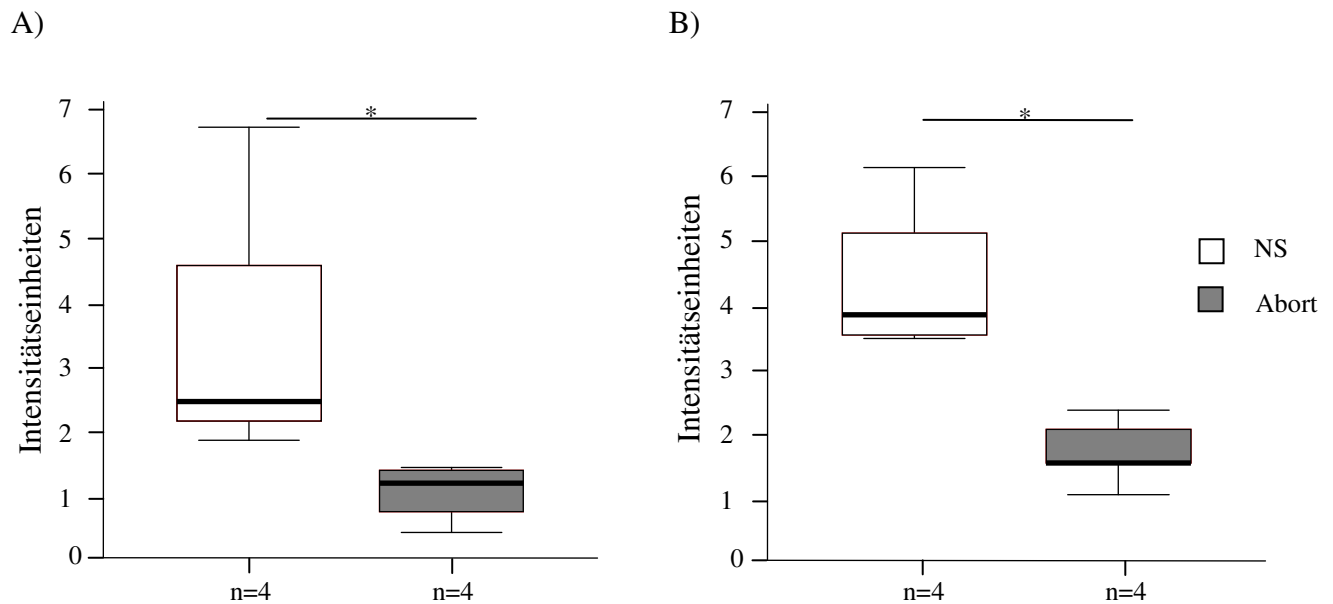


Abbildung 14: zeigt die positiven Western-Blot Banden als Box plots (Mediane) für A) iNOS und B) eNOS wobei jeweils links die positiven Banden aus der Analyse des Homogenisat normal-schwangerer Mäuse zu sehen sind und jeweils rechts die positiven Banden aus dem Homogenisat der Abortmäuse. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Imagequant TL Programm) bestimmt und anschließend mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests (\*:p<0,05) miteinander verglichen.

## 5.2 Induktion von HO-1 bzw. Hemmung von HO-1 und HO-2 in dem Mausmodell für einen spontanen Abort

Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass HO-1 und HO-2 im Laufe der Schwangerschaft eine Rolle spielen. Um die genaue Rolle von HO bei einer erfolgreichen Schwangerschaft zu untersuchen, wurde ein weiterer Tierversuch durchgeführt. Ziel dieses Versuches war es, HO-1 und HO-2 systemisch in den Mäusen hoch- bzw. runterzuregulieren, um untersuchen zu können, welchen Einfluss HO auf den Schwangerschaftsverlauf hat. In der Transplantationsimmunologie konnte mit Hilfe von Co-PP, einem bekanntem HO-1 Induzierer, eine verbesserte Akzeptanz des Transplantats über einen längeren Zeitraum erreicht werden (Tullius *et al.* 2002), weshalb wir vermuten, dass eine erhöhte HO Expression zu einem Schutz des Feten führt.

### 5.2.1 Verminderte Abortraten in Co-PP behandelten Tieren

DBA/2j verpaarte CBA/J Weibchen wurden am 4. Tag der Schwangerschaft mit Co-PP (5mg/kg) i.p. bzw. Zn-PP (40mg/kg) i.p. behandelt, um HO-1 hoch- bzw. HO-1 und HO-2 runterzuregulieren. Die normale Schwangerschaftskontrolle und die Kontrolle für den spontanen Abort erhielten beide eine neutrale Pufferlösung am Tag 4 der Schwangerschaft. Die Mäuse wurden entweder am Tag 8 oder am Tag 14 der Schwangerschaft getötet. An beiden Tagen wurden die Abortrate und die Implantationsrate der Tiere bestimmt. Die Analyse der am Tag 14 getöteten CBA/J Weibchen (Abb. 15A) zeigte, dass die Abortrate der spontanen Abortgruppe im Vergleich zu der normalen Schwangerschaftskontrolle signifikant erhöht war, welches die Daten des ersten Tierversuches bestätigte. Die Injektion von Co-PP führte zu einer signifikanten Reduktion der Abortrate im Vergleich zu der Abortgruppe, die eine neutrale Pufferlösung erhalten hatte. Die Abortrate der Tiere, die mit Zn-PP behandelt wurden, stieg hingegen im Vergleich zu allen anderen Gruppen des Versuches signifikant an. Das bedeutet, dass die Behandlung mit Co-PP vor einem spontanen Abort schützt, die Behandlung mit Zn-PP hingegen einen spontanen Abort induziert. Die Anzahl aller Implantationen war bei allen Gruppen vergleichbar und zeigte keine signifikanten Unterschiede, was einen Einfluss der Behandlung auf die Anzahl der Embryonen ausschließt (Abb. 15B). Die Abortrate am Tag 8 der Schwangerschaft konnte nicht ermittelt werden, da Aborte erst am Tag 8 der Schwangerschaft auftreten und somit keine Unterschiede zwischen den einzelnen Implantationen erkannt werden konnte. Die Anzahl der Implantation zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tab. VI).

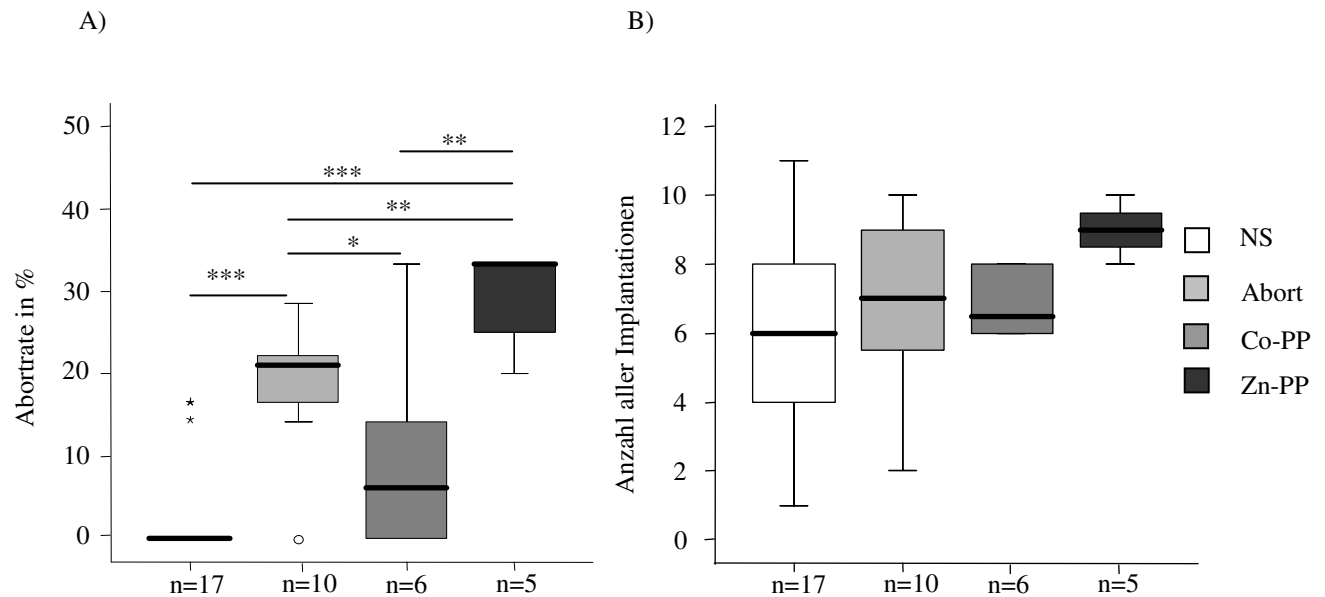


Abbildung 15: Die Daten werden als Box plots (Mediane) dargestellt. A) gezeigt wird die Abortrate in %. Die erste Gruppe von links stellt die normale Schwangerschaftsgruppe (NS) dar. Die zweite Gruppe steht für den spontanen Abort (A), welche mit PBS behandelt wurde. Die Kontrollgruppe für den spontanen Abort zeigt eine signifikante Erhöhung der Abortrate im Vergleich zu der Kontrollgruppe, was durch den Mann-Whitney-U Tests ermittelt wurde \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Die dritte Gruppe von links stellt die Abortgruppe dar, welche mit Co-PP behandelt wurde (Co-PP). Im Vergleich zu der Abortkontrollgruppe ist die Anzahl der Aborte signifikant reduziert. Bei der letzten Gruppe handelt es sich um die Abortgruppe, welche mit Zn-PP behandelt wurde (Zn-PP). Diese Gruppe zeigt im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine signifikante Erhöhung der Abortrate. B) Zu sehen ist die Anzahl der Implantationen aller Gruppen

<i>Implantationsrate</i>	<i>a) Abort (n=5)</i>	<i>b) Co-PP (n=4)</i>	<i>c) Zn-PP (n=3)</i>
	9,5	9	8

Tabelle VI: zeigt die Anzahl der Implantationen der behandelten Gruppen b) und c) im Vergleich zu der spontanen Abortgruppe a).

Die Daten werden als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

## 5.2.2 HO-1 und HO-2 Expression nach Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP

Die Expression von HO-1 und HO-2 4 bzw. 10 Tage nach der therapeutischen Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP sollte mit Hilfe verschiedener Methoden analysiert werden und anschließend mit den beiden Kontrollgruppen, welche mit einer neutralen Pufferlösung behandelt wurden, verglichen werden.

### 5.2.2.1 Untersuchungen von HO-1 und HO-2 mittels IHC bei Mäusen die mit CO-PP bzw. Zn-PP behandelt wurden

Nach der spezifischen Färbung der histologischen Plazentaschnitten mittels IHC zeigte sich, dass die Expression von HO-1 und HO-2 zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar war.

Die Analyse der Plazenta zeigte, dass die Proteinexpression von HO-1 und HO-2 in der spontanen Abortgruppe, welche mit PBS behandelt wurde, in allen Zelltypen der Plazenta im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe signifikant reduziert war (Abb. 16 und 18). Damit wurde das Ergebnis des ersten Tierversuchs bestätigt.

Die Expression von HO-1 war in den Spongiotrophoblasten und den Labyrinthzellen signifikant erhöht. Bei der Behandlung mit Zn-PP konnte man bei HO-1 in allen Zelltypen keine Veränderung in der Proteinexpression im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachten (Abb. 16 und 17). Eine Behandlung mit Co-PP führte im Vergleich mit der Abortkontrollgruppe, zu einer signifikant erhöhten Expression von HO-2 in allen Zelltypen der Plazenta (Abb. 18 und 19). Die Expression von HO-2 hingegen war in den Riesenzellen und in den Labyrinthzellen nach einer Behandlung mit Zn-PP signifikant erhöht (Abb. 18B).

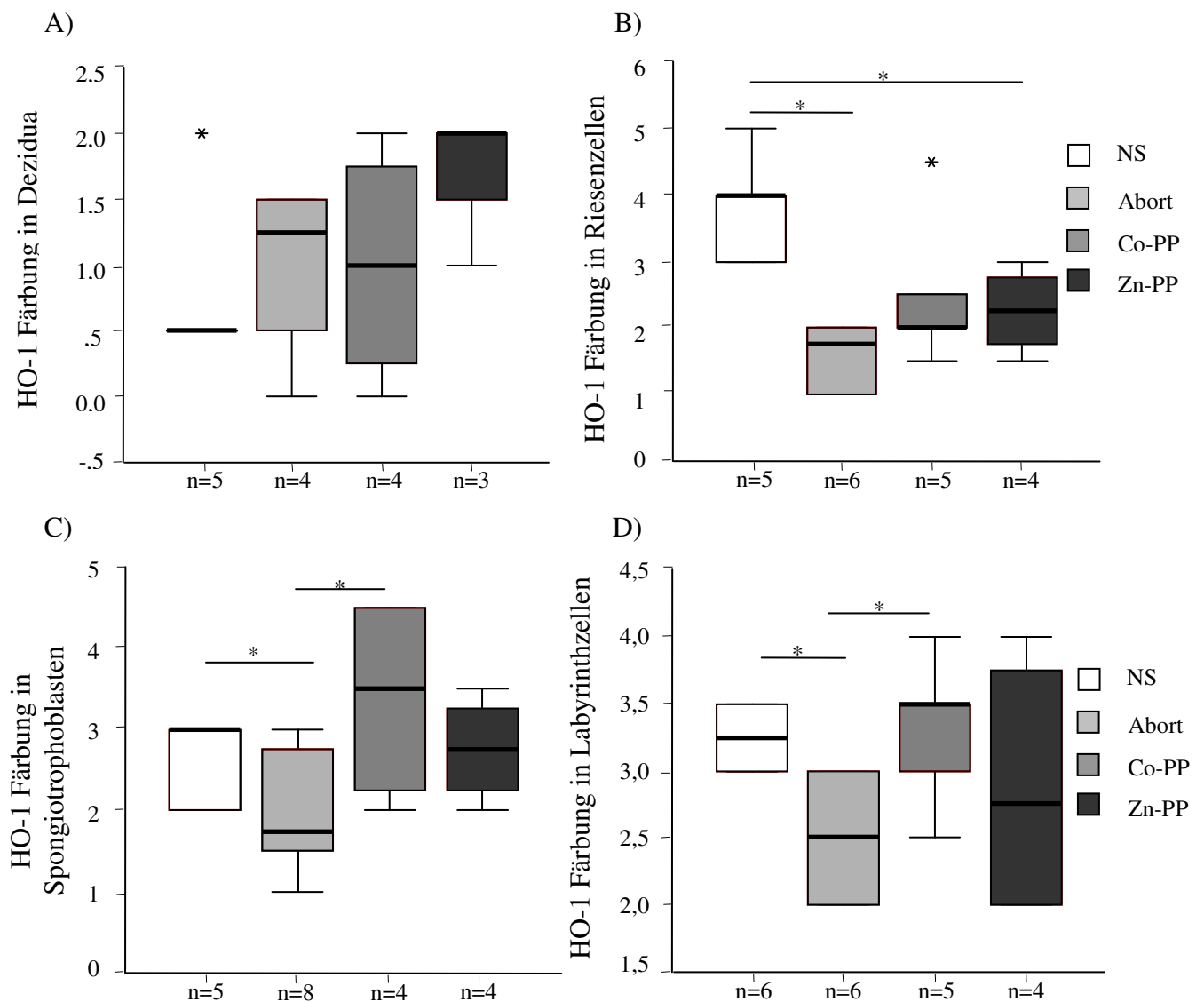


Abbildung 16: HO-1 Expression in A) der Dezidua, B) den Riesenzellen, C) den Spongiotrophoblasten und D) den Labyrinthzellen, dargestellt als Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten selbst werden als Box Plots (Mediane) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:  $p < 0,05$ ).



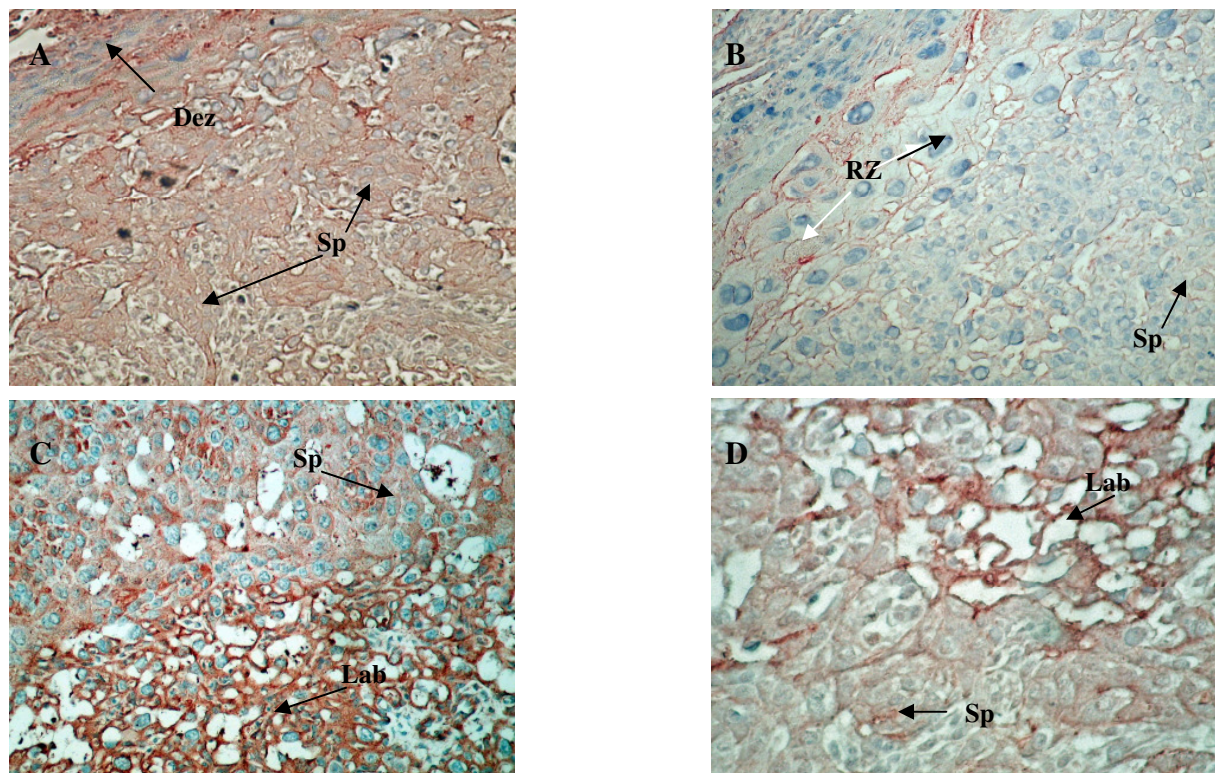
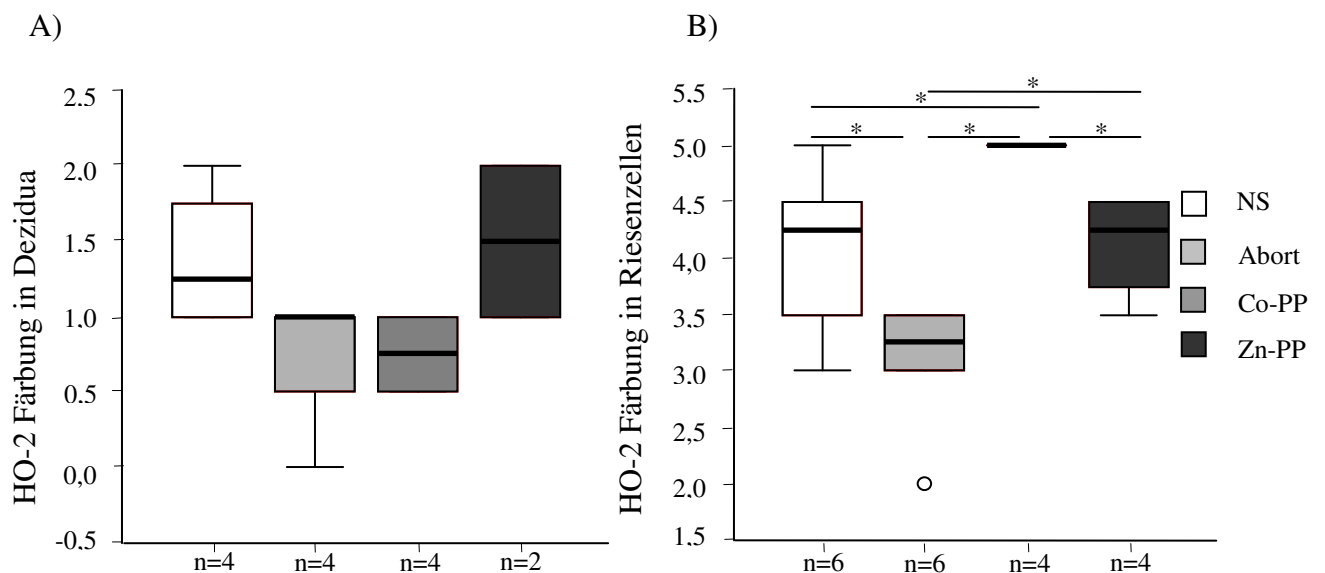


Abbildung 17: Repräsentative IHC-Bilder HO-1 positiver Deziduazellen (Dez), Labyrinthzellen (Lab), Spongiotrophoblasten (Sp) und Riesenzellen (RZ) der Plazenta A) Normale Schwangerschaft B) Abortkontrolle C) Co-PP behandelte Tiere D) Zn-PP behandelte Tiere



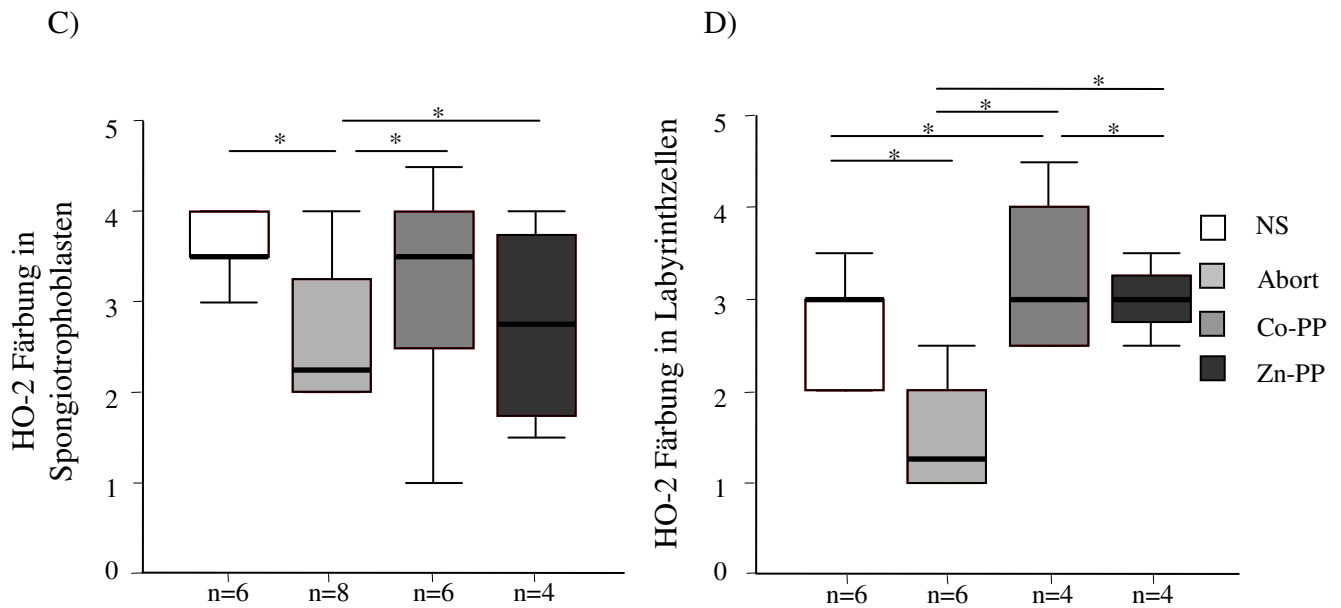


Abbildung 18: HO-2 Expression in A) der Dezidua, B) den Riesenzellen, C) den Spongiotrophoblasten und D) den Labyrinthzellen, dargestellt als Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten selbst werden als Box plots (Mediane) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:  $p < 0,05$ )

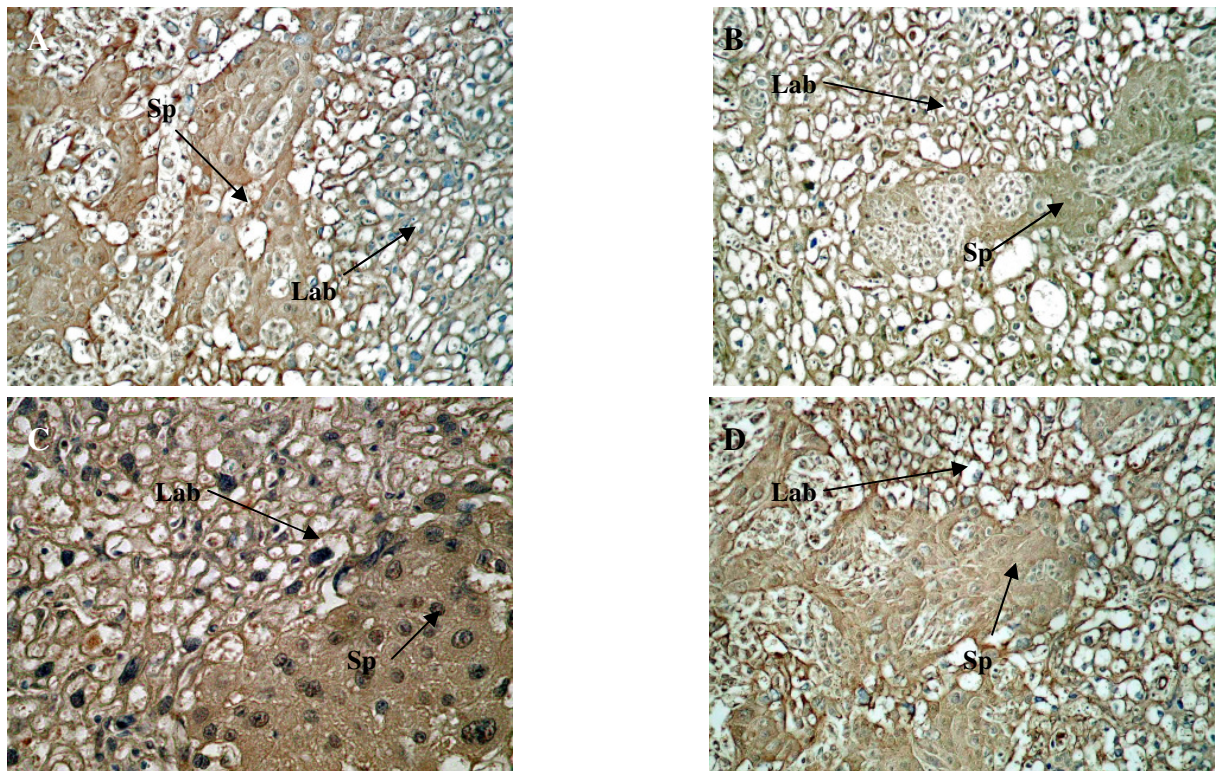


Abbildung 19: Repräsentative IHC-Bilder HO-2 positiver Labyrinthzellen (Lab) und Spongiotrophoblasten (Sp) der Plazenta A) Normale Schwangerschaft B) Abortkontrolle C) Co-PP behandelte Tiere D) Zn-PP behandelte Tiere

### 5.2.2.2 HO-1 und HO-2 Western-Blot Analyse

Am Tag 14 der Schwangerschaft konnte bei Mäusen der Abortgruppe, welche mit PBS behandelt wurden, eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von HO-1 und von HO-



2 im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe festgestellt werden (Abb. 20), welches die Ergebnisse des ersten Tierversuches bestätigt. Eine Behandlung mit Co-PP führte bei beiden Formen von HO zu einem signifikanten Anstieg in der Proteinexpression (Abb. 20 A und B). Eine Behandlung mit Zn-PP führte jedoch nicht, wie erwartet, zu einer Reduktion der Proteinexpression, was vermutlich am späten Zeitpunkt der Schwangerschaft liegt und die Mäuse bereits begonnen haben, den schädlichen Auswirkungen der Zn-PP mit einer erhöhten Expression von HO-1 entgegen zu wirken. Bei HO-2 konnte man keine Unterschiede zwischen der Abortkontrollgruppe und der mit Zn-PP behandelten Gruppe beobachten, bei HO-1 kommt es am Tag 14 der Schwangerschaft sogar zu einem signifikanten Anstieg in der Proteinexpression nach einer Behandlung mit Zn-PP.

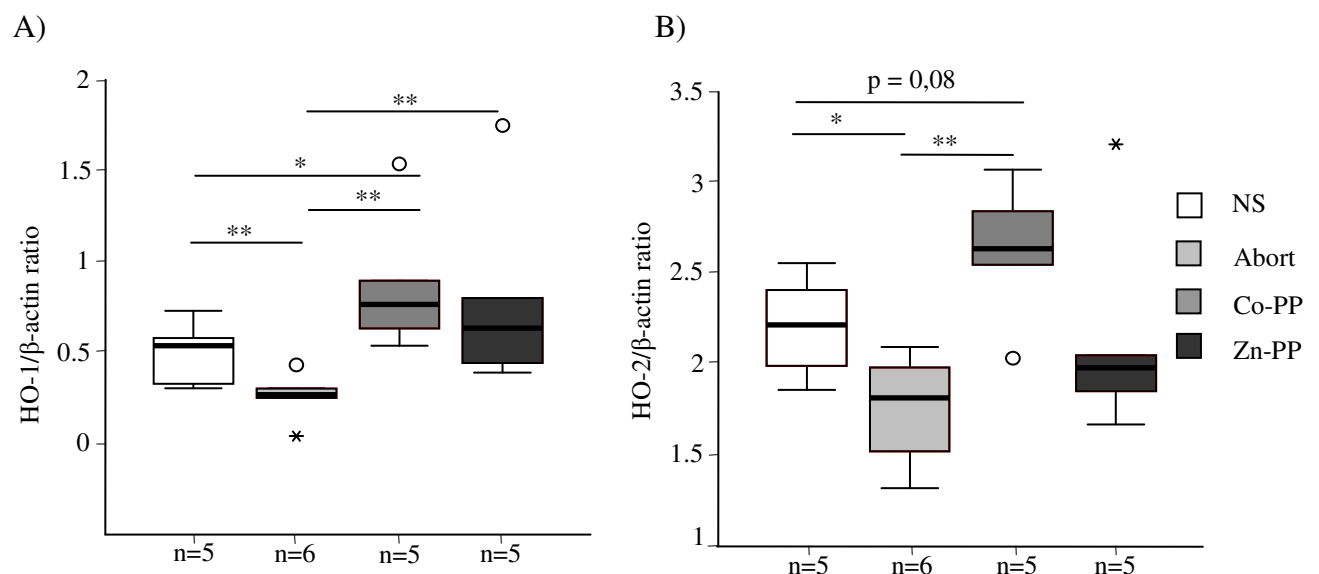


Abbildung 20 zeigt die Ratio von A) HO-1/ Beta-actin und B) HO-2/ Beta-actin als Box plot (Mediane). Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Imagequant TL Programm) bestimmt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests. (\*:p<0,05, \*\*: p<0,01) errechnet. Die erste Gruppe von links stellt die normale Schwangerschaftsgruppe (NS) dar. Die zweite Gruppe steht für den spontanen Abort (Abort), welche mit PBS behandelt wurde. Die dritte Gruppe von links stellt die Abortgruppe dar, welche mit Co-PP behandelt wurde (Co-PP). Bei der letzten Gruppe handelt es sich um die Abortgruppe, welche mit Zn-PP behandelt wurde (Zn-PP).

### 5.2.2.3 RT-PCR Analyse von HO-1

Um die HO-1 mRNA nachzuweisen, wurde zuerst aus der Plazenta mit Hilfe von Trizol die RNA isoliert. Die RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben, damit eine Analyse mittels Real-Time RT-PCR möglich wurde. Die cDNA wurde dann zusammen mit einem spezifischen Primermix für HO-1, welcher aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer bestand und einer spezifischen HO-1 Sonde einem Standardinkubationsprogramm unterzogen, um die für HO-1 spezifische cDNA zu amplifizieren. Mit Hilfe der Fluoreszenz der Sonde konnte man dann die Menge an amplifizierter cDNA messen. Als *house keeping gene* wurde β-Actin verwendet. Bei der Analyse der Genexpression von HO-1 konnte man am Tag 14 der

Schwangerschaft keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachten (Tab. VII). Am Tag 8 der Schwangerschaft konnte man in den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden, im Vergleich zu den Abortkontrollmäusen einen leichten Anstieg an HO-1 mRNA beobachten (Tab. VIII). Die Tiere die mit Zn-PP behandelt wurden, zeigten, wenn man sie mit den Kontrollabortmäusen verglich, einen Rückgang in der HO-1 mRNA, welcher jedoch nicht signifikant war.

<b>HO-1</b>	<b>a) NS (n=5)</b>	<b>b) Abort (n=6)</b>	<b>c) Co-PP (n=5)</b>	<b>d) Zn-PP (n=5)</b>
	0,05513	0,05997	0,04465	0,04423

Tabelle VII:  $mRNA\ 2^{-\Delta cT}$  von HO-1 im Gewebe der Plazenta. Die  $mRNA\ 2^{-\Delta cT}$  wird als Median dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

<b>HO-1</b>	<b>b) Abort (n=6)</b>	<b>c) Co-PP (n=5)</b>	<b>d) Zn-PP (n=5)</b>
	0,00081	0,00215	0,00012

Tabelle VIII:  $mRNA\ 2^{-\Delta cT}$  von HO-1 im Gewebe der Plazenta. Die  $mRNA\ 2^{-\Delta cT}$  wird als Median dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

### 5.2.3 Th1 und Th2 Zytokinproduktion nach Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP

#### 5.2.3.1 Durchflusszytometrie-Analyse der Milz aus Tieren des murinen Abortmodells am Tag 8 der Schwangerschaft

Bei der Präparation der Mäuse am Tag 8 der Schwangerschaft wurde die Milz gewonnen und aus dieser Lymphozyten isoliert. Die Lymphozyten der einzelnen Gruppen wurden gepoolt, mit Ionomycin und PMA stimuliert und mit spezifischen Zytokin-Antikörpern inkubiert, um später im Durchflusszytometer die Zytokinproduktion in diesen Lymphozyten bestimmen zu können.

Der Prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen ist in allen drei Gruppen vergleichbar. Man kann daher davon ausgehen, dass beide Zelltypen für die Produktion der Zytokine verantwortlich waren. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen der Abortgruppe und den behandelten Gruppen beobachtet werden. Auch die Th1/Th2 Ratio weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Tab.IX). Dennoch kann man eine leichte Senkung der Th1/Th2 Ratio bei beiden behandelten Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachten (Abb. 21)

<b>Zytokine</b>	<b>b) Abort (n=3)</b>	<b>c) Co-PP (n=5)</b>	<b>d) Zn-PP (n=3)</b>
<b>Milz</b>			
TNF- $\alpha$	1,88	0,75	1,9
IFN- $\gamma$	3,31	1,82	1,43
IL-10	0,69	0,6	0,78
IL-4	0,82	0,73	1,11

**CD-Marker**

CD4	29,92	27,53	25,18
CD8	0,4	0,39	0,72
CD25	20,63	19,66	17,12
CD4/CD25	0,18	0,11	0,5

Tabelle IX: Th1/Th2 Zytokineproduktion in Abortmäusen (Ab) im Vergleich mit Co-PP oder Zn-PP behandelten Abortmäusen am 8. Tag der Schwangerschaft. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der positiven Zellen als Median. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

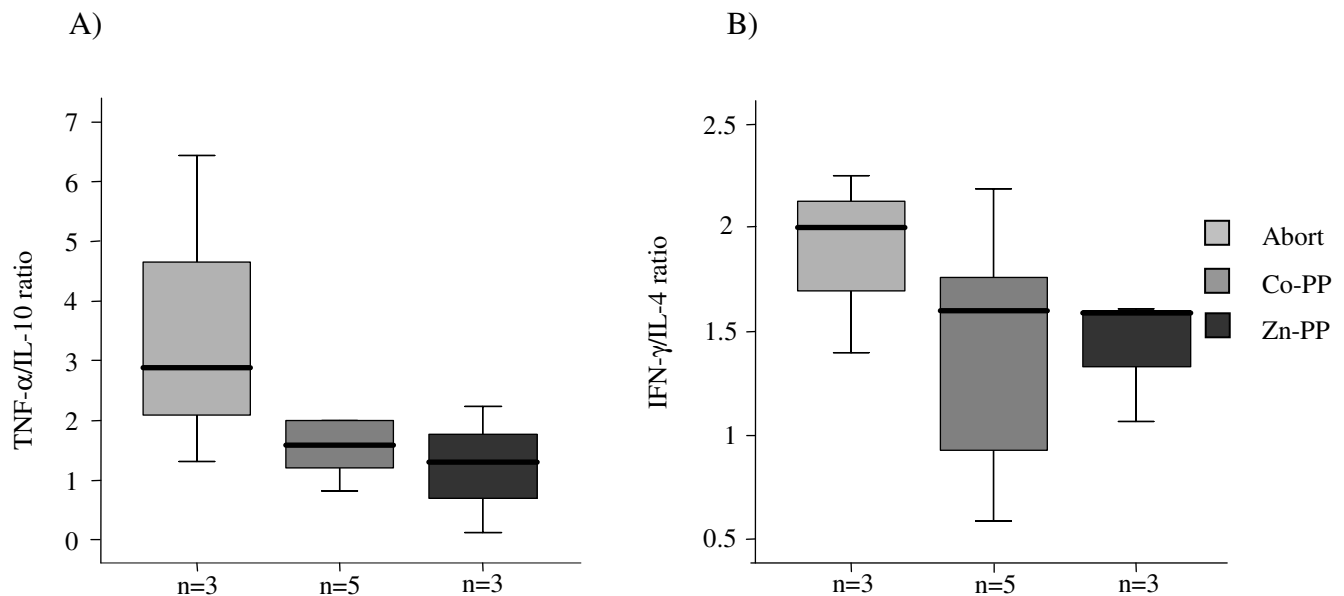


Abbildung 21: Th1/Th2 Ratio als Box plots (Mediane) in Abortmäusen (A) im Vergleich mit Co-PP oder Zn-PP behandelten Abortmäusen am 8. Tag der Schwangerschaft. Dargestellt ist die Ratio von A) TNF- $\alpha$ /IL-10 und B) IFN- $\gamma$ /IL-4. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

### 5.2.3.2 Durchflusszytometrie-Analyse der Dezidua und Milz aus Mäusen des spontanen Abortmodells am Tag 14 der Schwangerschaft

Am Tag 14 der Schwangerschaft wurden aus der Dezidua und der Milz die Lymphozyten isoliert. Nach einer vierstündigen Stimulation der Zellen mit Ionomycin und PMA erfolgte die markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern. Mittels der Durchflusszytometrie wurden diese Zellen dann zum einen nach ihren CD hin sortiert und zum zweiten auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht. Ähnlich wie am Tag 8 der Schwangerschaft wurden die Zytokine von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen produziert. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied in dem prozentualen Anteil von CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. In der Milz der Mäuse, die mit Zn-PP behandelt wurden, konnte eine signifikante Reduktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-4 im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen beobachtet werden (Tab. X). In der Dezidua hingegen

zeigten TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  eine signifikante Reduktion im Vergleich zu der Abortkontrollgruppe und der Co-PP behandelten Gruppe.

<i>Milz</i>	<i>a) NS (n=5)</i>	<i>b) Abort (n=5)</i>	<i>c) Co-PP (n=6)</i>	<i>d) Zn-PP (n=4)</i>
<b>Zytokine</b>				
TNF- $\alpha$	1,36 (d*)	0,92 (d*)	1,63 (d**)	0,49
IFN- $\gamma$	1,09 (d*)	0,81 (d*)	1,06 (d**)	0,29
IL-10	1,02	0,54	1,42 (d**)	0,67
IL-4	0,48 (d*)	0,49 (d*)	0,48 (d*)	0,12
<b>CD-Marker</b>				
CD4	10,61	7,65	10,21	10,84
CD8	9,53	6,65	7,83	8,16
CD25	1,81	1,51	2,05	0,70
CD4/CD25	1,01	0,78	0,99	0,56

<i>Dezidua</i>	<i>a) NS (n=5)</i>	<i>b) Abort (n=5)</i>	<i>c) Co-PP (n=6)</i>	<i>d) Zn-PP (n=4)</i>
<b>Zytokine</b>				
TNF- $\alpha$	1,83	4,25 (d*)	2,85 (d**)	1,07
IFN- $\gamma$	2,46	3,05 (d*)	3,87 (d**)	0,90
IL-10	1,72	2,19	1,90	3,93
IL-4	0,99	1,54	0,95	2,78
<b>CD-Marker</b>				
CD4	2,14	2,79	5,43	9,67
CD8	5,46	4,71	17,43	11,28
CD25	1,91	4,52	3,77	9,14
CD4/CD25	2,38	5,85	3,30	3,01

Tabelle X: Th1/Th2 Zytokine Produktion in Abortmäusen (Abort) und normalen schwangeren Mäusen (NS), im Vergleich mit Co-PP oder Zn-PP behandelten Abortmäusen am 14. Tag der Schwangerschaft. Dargestellt ist die prozentuale Anteil der positiven Zellen als Median. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des MannWhitney-*U* Tests (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ) ermittelt.

Bei der Analyse der Th1/Th2 Ratio in der Milz (Abb. 22) und in der Dezidua (Abb. 23) zeigte sich, dass die TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio (Abb. 22A) in der Zn-PP behandelten Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen in der Milz signifikant reduziert war. Bei der Ratio von IFN- $\gamma$ /IL-4 (Abb. 22B) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Dezidua konnte ebenso ein Rückgang der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio in der Zn-PP Gruppe beobachtet werden, jedoch war dieser nicht signifikant (Abb. 23A). Die IFN- $\gamma$ /IL-4 Ratio zeigte auch in der Dezidua keine Unterschiede (Abb. 23B).

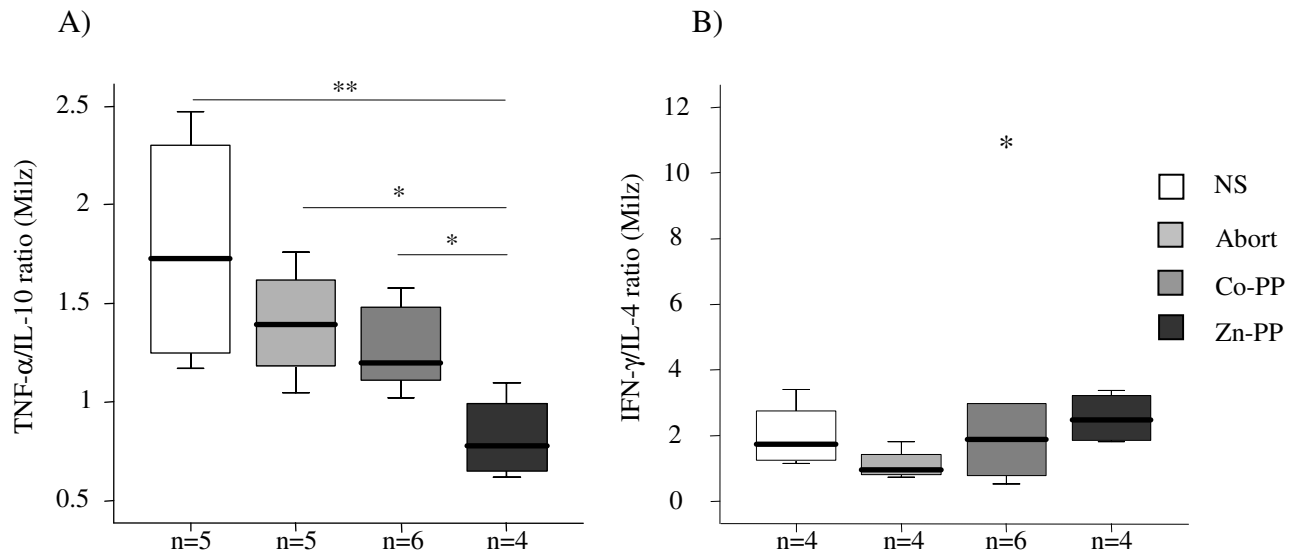


Abbildung 22: Th1/Th2 Ratio der Milz in Abortmäusen (Abort) und normal-schwangeren Kontrollmäusen (NS) im Vergleich mit Co-PP oder Zn-PP behandelten Abortmäusen am 14. Tag der Schwangerschaft. Dargestellt ist die Ratio von A) TNF- $\alpha$ /IL-10 und B) IFN- $\gamma$ /IL-4 als Box plots (Mediane). Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des MannWhitney-U Tests (\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ ) ermittelt.

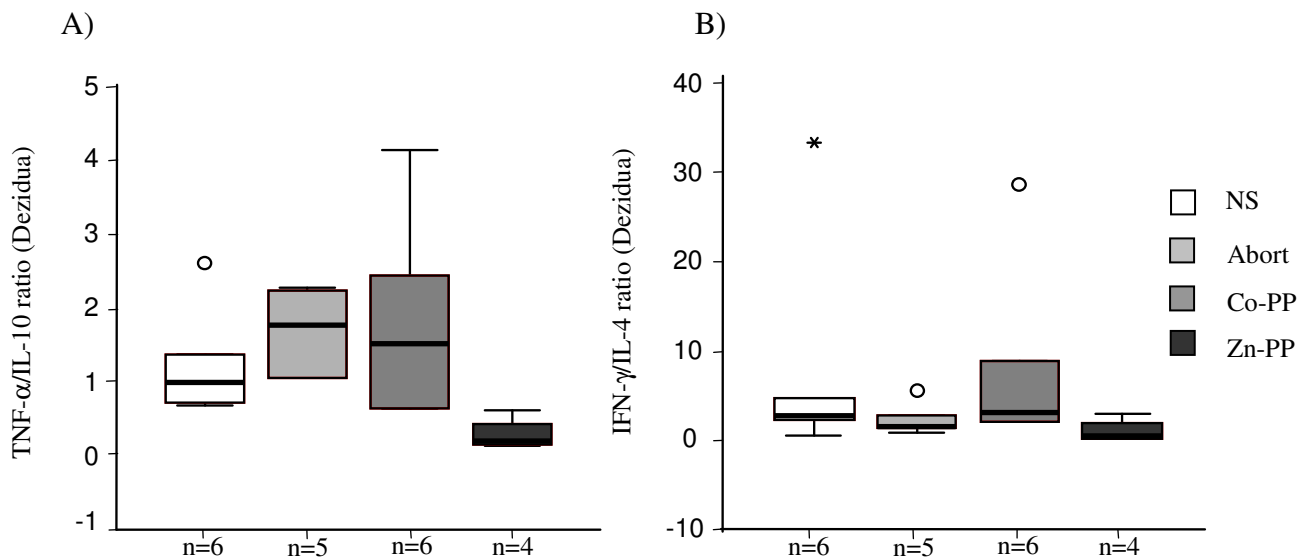


Abbildung 23: Th1/Th2 Ratio der Milz in Abortmäusen (A) und normal-schwangeren Kontrollmäusen (NS) im Vergleich mit Co-PP oder Zn-PP behandelten Abortmäusen am 14. Tag der Schwangerschaft. Dargestellt ist die Ratio von A) TNF- $\alpha$ /IL-10 und B) IFN- $\gamma$ /IL-4 als Box plots (Mediane). Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des MannWhitney-U Tests ermittelt.

### 5.2.3.3 Real-Time RT-PCR von TNF- $\alpha$ und TGF- $\beta$ am Tag 8 und 14 der Schwangerschaft

Zur Analyse der TNF- $\alpha$  mRNA wurde eine Real-Time RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde aus der Plazenta RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die spezifische Gensequenz der cDNA von TNF- $\alpha$  wurde dann mit Hilfe entsprechender Primer amplifiziert und mit Hilfe einer spezifischen Sonde sichtbar gemacht. An beiden untersuchten Tagen der Schwangerschaft konnte eine erhöhte, wenn auch nicht signifikante Menge an TNF- $\alpha$  mRNA in den Tieren beobachtet werden (Abb. 24 A und B), die mit Co-PP behandelt wurden, wenn

man sie mit der Abortkontrollgruppe verglich. Die Analyse der Proben zeigte sowohl am Tag 8 (Abb. 24A) als auch am Tag 14 (Abb. 24B) der Schwangerschaft tendenziell reduzierte Mengen von TNF- $\alpha$  mRNA in den Tieren, die mit Zn-PP behandelt wurden, im Vergleich zu den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden. Am Tag 8 der Schwangerschaft konnten auch reduzierte Mengen von TNF- $\alpha$  mRNA in der Zn-PP Gruppe im Vergleich mit der Abortkontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 24A)

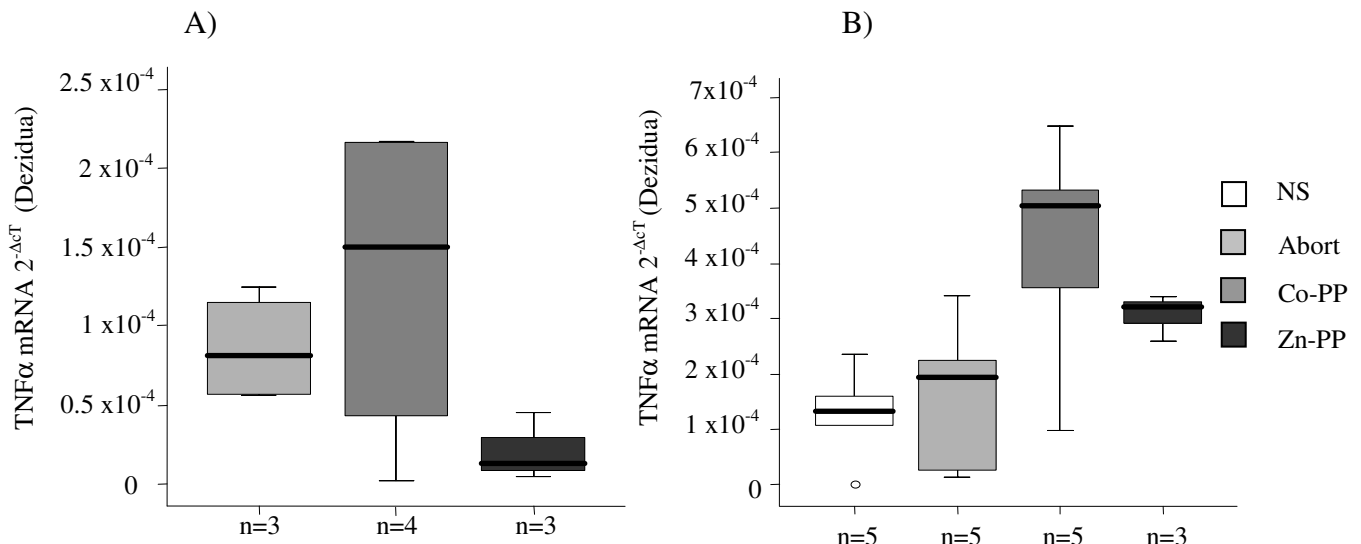


Abbildung 24: Die Daten von TNF- $\alpha$  mRNA  $2^{-\Delta ct}$  sind als Box plots (Mediane) dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt A) TNF- $\alpha$  mRNA  $2^{-\Delta ct}$  am Tag 8 der Schwangerschaft B) TNF- $\alpha$  mRNA  $2^{-\Delta ct}$  am Tag 14 der Schwangerschaft.

Um einen möglichen Einfluss von Th3-Zytokinen bzw. deren Interaktion mit HO im Laufe eines HO induzierten Schwangerschaftsschutzes zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Real-Time RT-PCR TGF- $\beta$  untersucht (Tab. IX).

Hierbei zeigte es sich, dass am Tag 8 der Schwangerschaft keinen signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auftraten. Am Tag 14 der Schwangerschaft konnte man hingegen signifikant erhöhte Mengen an TGF- $\beta$  in der Zn-PP Gruppe beobachten, wenn man sie mit der normalen Schwangerschaftsgruppe verglich.

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>a) Abort (n=5)</b>	<b>b) Co-PP (n=4)</b>	<b>c) Zn-PP (n=3)</b>
Tag 8 der Schwangerschaft	0,63	0,32	0,82

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>a) NS (n=6)</b>	<b>b) Abort (n=6)</b>	<b>c) Co-PP (n=6)</b>	<b>d) Zn-PP (n=5)</b>
Tag 14 der Schwangerschaft	0,18	0,25	0,29	1,63 (a*)

Tabelle XI: Die Daten von TGF- $\beta$  mRNA  $2^{-\Delta ct}$  sind als Mediane dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests (\*P < 0,05) durchgeführt.

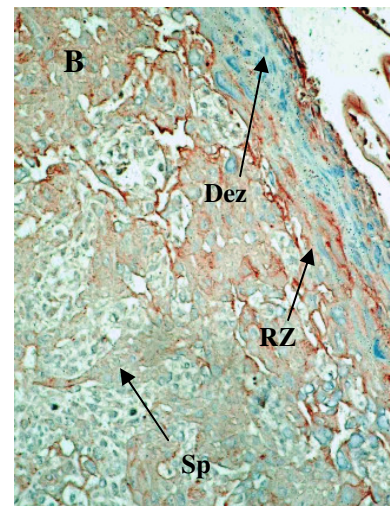
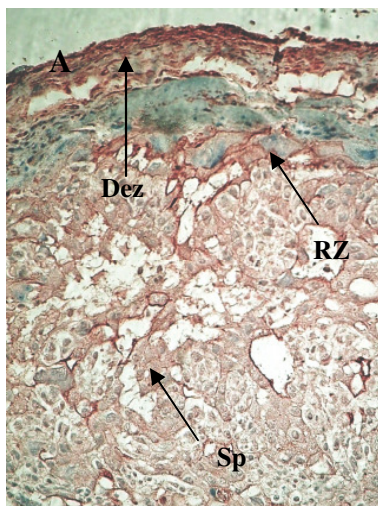
## 5.2.4 iNOS und eNOS Expression nach der Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP oder Zn-PP

### 5.2.4.1 Proteinexpression-Analyse von iNOS und eNOS mittels IHC am Tag 14 der Schwangerschaft

Die Zellen der in Paraffin eingebetteten Plazenten wurden auf ihre gruppenspezifische Expression von iNOS und eNOS hin untersucht. In den Zelltypen der Plazenta konnte sowohl bei iNOS als auch bei eNOS kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Tab. XII, Abb. 25). Nur die Riesenzellen und die Dezidua zeigten nach der Behandlung mit Co-PP eine signifikant erhöhte Expression von iNOS und eNOS im Vergleich mit der normalen Schwangerschaftsgruppe bzw. der Kontrollgruppe für den spontanen Abort.

<i>iNOS</i>	<i>a) NS (n=4)</i>	<i>b) Abort (n=5)</i>	<i>c) Co-PP (n=5)</i>	<i>d) Zn-PP (n=5)</i>
Dezidua	1,75(c*)	2,00(c*)	3,25	2,50
Riesenzellen	0,25	0,00(c*)	0,75	0,75
Spongiotrophoblasten	1,50	1,00	1,25	1,75
Labyrinthzellen	1,00	0,50	1,25	1,00
<b>eNOS</b>				
Dezidua	3,75(b*)	1,75(c*)	2,50	2,75
Riesenzellen	0,50(c*)	0,50	1,00	0,50
Spongiotrophoblasten	1,00	1,00	1,75	1,25
Labyrinthzellen	1,00	1,50	1,75	1,25

Tabelle XII: iNOS und eNOS Expression in verschiedenen Zelltypen der Plazenta und der Dezidua, dargestellt als Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten werden als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:p < 0,05).





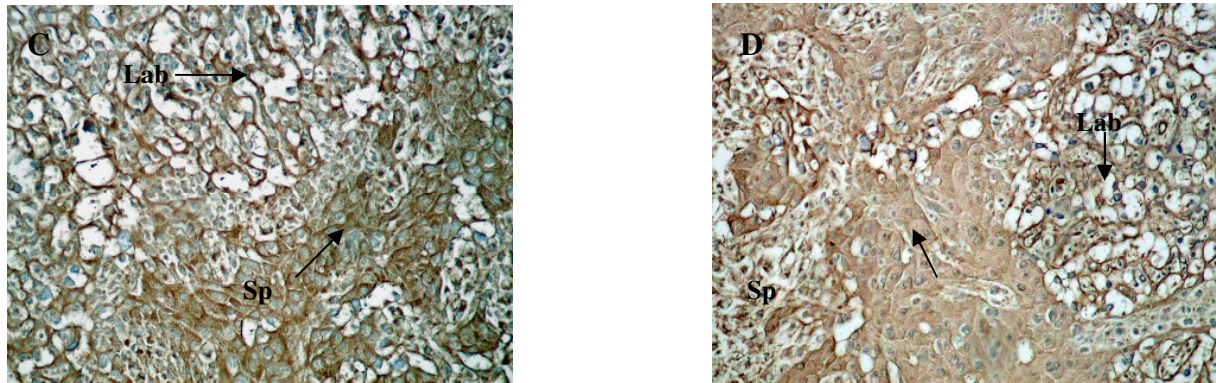


Abbildung 25: Repräsentative IHC-Bilder der Plazenta. Um iNOS und eNOS optisch auch voneinander zu unterscheiden, wurden verschiedene Chromogene zur Visualisierung verwendet. A und B) iNOS positive Riesenzelle (RZ), Deziduazellen (Dez) und Spongiotrophoblasten an der Feto-maternalen Grenze (AEC-Färbung, rötliche Färbung) A) Co-PP behandelte Tiere B) Zn-PP behandelte Tiere. C und D) HO-2 positive Riesenzelle (RZ), Deziduazellen (Dez) und Spongiotrophoblasten (Sp) (DAB-Färbung, bräunliche Färbung) C) Co-PP behandelte Tiere D) Zn-PP behandelte Tiere

#### 5.2.4.2 iNOS und eNOS Proteinexpression-Analyse mittels Western-Blot am 14. Tag der Schwangerschaft

Die spezifischen Proteinbanden der beiden Moleküle wurden nach einem Western-Blot auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Ratio wurde aus der Intensität der Banden von iNOS oder eNOS gegen die Intensität der Beta-Actin Banden berechnet. Die Western-Blot Analyse zeigte eine reduzierte Expression von iNOS und eNOS der Abortgruppe im Vergleich zu der normalen Schwangerschaftsgruppe. Die Ergebnisse vom ersten Tierversuch konnten jedoch nur zum Teil bestätigt werden, da die reduzierte Expression nicht signifikant war. In den Tieren, die mit Co-PP und Zn-PP behandelt wurden, konnte keine Veränderung in der Expression von iNOS und eNOS beobachtet werden (Abb 26A und 26B).



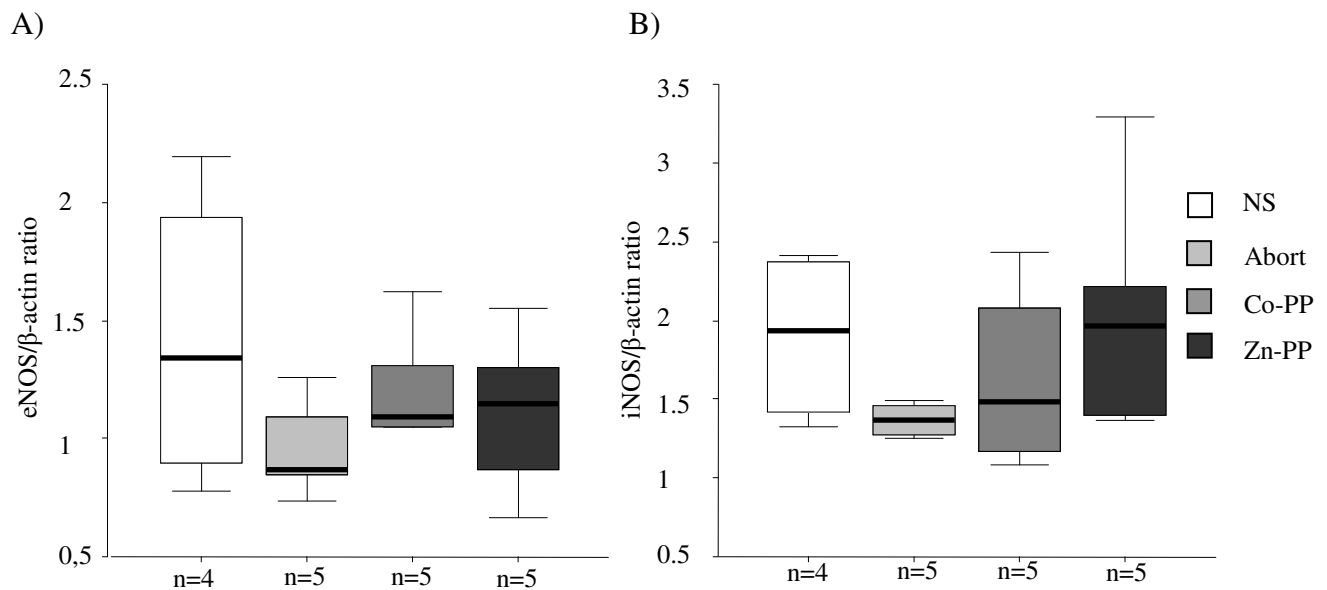


Abbildung 26 zeigt die Ratio von A) eNOS/ Beta-actin und B) iNOS/ Beta-actin. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Imagequant TL Programm) bestimmt. Die Daten werden als Box plots (Mediane) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests errechnet.

#### 5.2.4.3 Real-Time RT-PCR von iNOS und eNOS nach der Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP am 8 und 14 Tag der Schwangerschaft

Um mögliche Unterschiede in der Expression von iNOS und eNOS zwischen Tag 8 und Tag 14 der Schwangerschaft zu untersuchen, wurde eine Real-Time RT-PCR durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede in der Expression von iNOS und eNOS zwischen den Gruppen am Tag 14 der Schwangerschaft beobachtet werden (Tab. XIII). Am Tag 8 der Schwangerschaft konnte man lediglich in der Co-PP Gruppe eine leichte Erhöhung der mRNA von iNOS feststellen.

<b>Tag 8 der Schwangerschaft</b>		<b>a) Abort (n=5)</b>	<b>b) Co-PP (n=4)</b>	<b>c) Zn-PP (n=3)</b>
eNOS	/	0,098	0,092	0,098
iNOS	/	0,001	0,009	0,002
<b>Tag 14 der Schwangerschaft</b>		<b>a) NS (n=6)</b>	<b>b) Co-PP (n=6)</b>	<b>c) Zn-PP (n=5)</b>
eNOS	0,041	0,021	0,058	0,129
iNOS	0,025	0,030	0,020	0,016

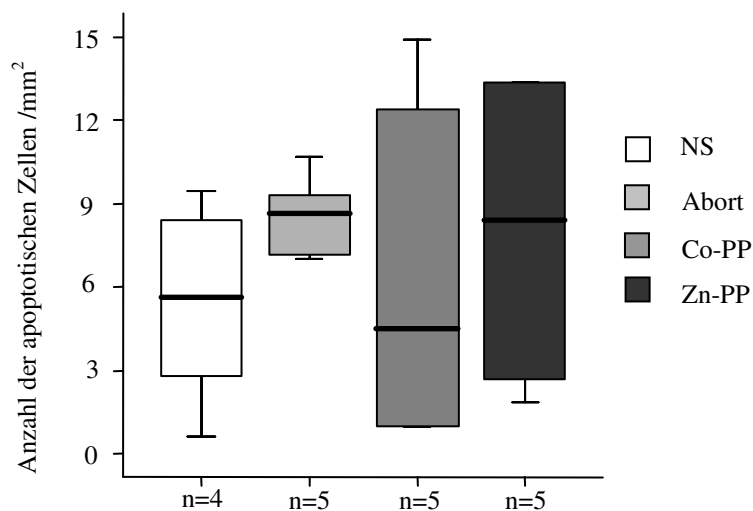
Table XIII: Die iNOS und eNOS mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Raten der Plazenta sind als Mediane dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.

## 5.2.5 Beeinflussung der Apoptose nach der Behandlung mit Co-PP bzw. Zn-PP

### 5.2.5.1 TUNEL-Analyse in der Plazenta von Co-PP bzw. Zn-PP behandelten Mäusen

Der HO wurden anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben. Um zu untersuchen, ob der HO induzierte Schwangerschaftsschutz in Verbindung mit diesen anti-apoptotischen Eigenschaften steht, wurde eine TUNEL-Analyse durchgeführt, durch die man die Anzahl der apoptotischen Zellen nachweisen kann. Die Anzahl der apoptotischen Kerne/mm<sup>2</sup> wurde bestimmt, um die Apoptosis-Rate in der Plazenta zu ermitteln. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 27A). Es konnten jedoch Tendenzen beobachtet werden. So war die Anzahl von apoptotischen Zellen in der Abortkontrollgruppe (Abb.27C) im Vergleich zur normalen Schwangerschaftsgruppe erhöht. Die Tiere, die mit Co-PP behandelt wurden, zeigten einen deutlichen Rückgang des Medians der Apoptosis-Rate im Vergleich zu den Mäusen der Abortkontrollgruppe. Die mit Zn-PP behandelten Tiere zeigten keinen Unterschied zu der Abortkontrollgruppe (Abb. 27D).

A)



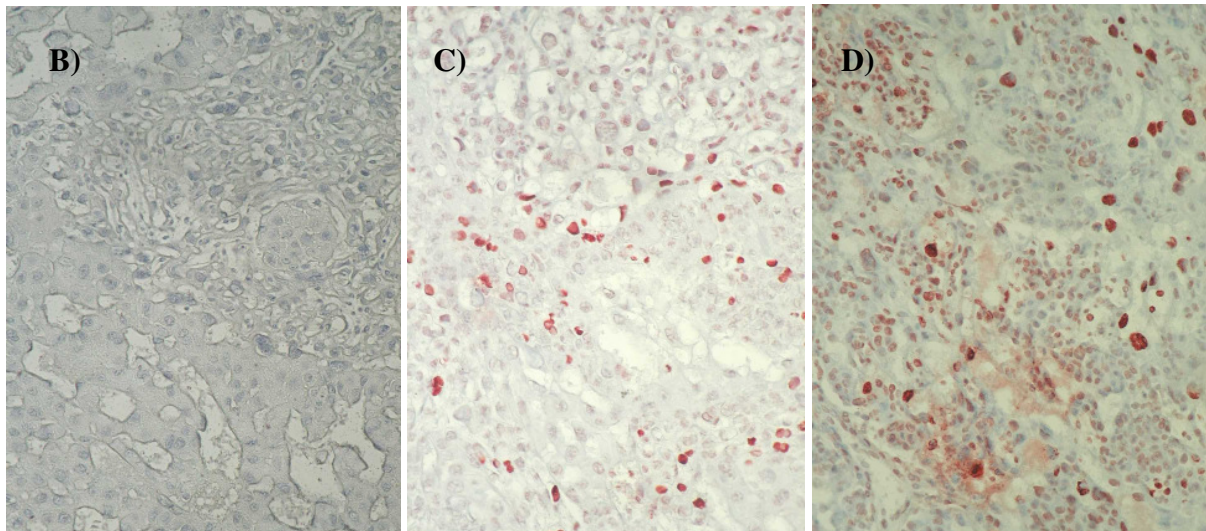


Abbildung 27: (A) Die Anzahl der apoptotischen Zellen in placentalem Gewebe. Die Daten sind als Box plots (Mediane) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-*U* Tests ermittelt. (B) Negativ Kontrolle bei der keine Enzym-Lösung verwendet wurde. (C) und (D) zeigen die typischen rot angefärbten apoptotischen Zellkerne in der Abortgruppe (C) und der Zn-PP behandelten Gruppe (D)

### 5.3 HO in dem Mausmodell für Präeklampsie

Eine weitere sehr ernste Schwangerschaftskomplikation ist die Präeklampsie. Die bisherigen Studien über HO und dessen Rolle während dieser Schwangerschaftskomplikation sind im Gegensatz zum spontanen Abort sehr widersprüchlich. Barber *et al.* (2001) konnte nur sehr geringe Expression von HO-1 bei Frauen mit Präeklampsie beobachten, Ahmed *et al.* (2000) hingegen beobachtete signifikant reduzierte Mengen von HO-1 in Patientinnen mit Präeklampsie, im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen. Zenclussen *et al.* (2003) konnte zwar ebenfalls einen Rückgang in der HO-1 Expression beobachten, welcher aber nicht signifikant war.

Weiterhin existieren keine Daten über die HO Expression im Tiermodell für Präeklampsie. Ziel dieses Versuches war es daher, die Rolle von HO in einem Mausmodell für Präeklampsie zu untersuchen und durch eine Induktion bzw. Reduktion der HO Expression mit Hilfe einer Behandlung mit Co-PP bzw. Zn-PP zu untersuchen, ob HO einen direkten Einfluss auf die Symptome der Präeklampsie nehmen kann.

#### 5.3.1 Die Präeklampsie-Gruppe und die normale Schwangerschaftsgruppe zeigen keine Unterschiede in der Implantationsrate

Balb/c Weibchen wurden mit C57BL/6 Männchen verpaart. Am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft wurde die Kontrollgruppe mit PBS behandelt, die Mäuse der

Präeklampsiegruppe (PE) erhielten hingegen  $3 \times 10^7$  aktivierte Th1 Zellen i.v. injiziert. Am Tag 14 der Schwangerschaft wurden die Mäuse getötet, die Anzahl der Implantationen und die Abortrate dokumentiert und Organe für weitere Versuche gewonnen. Die Implantationsrate war bei beiden Gruppen gleich, auch die Abortrate zeigte keine Unterschiede (Abb. 28). Die Aborte, die in Abb. 28 A dargestellt sind, traten am Tag 8 der Schwangerschaft auf und sind daher nicht mit den Präeklampsie-ähnlichen Symptomen in Verbindung zu bringen.

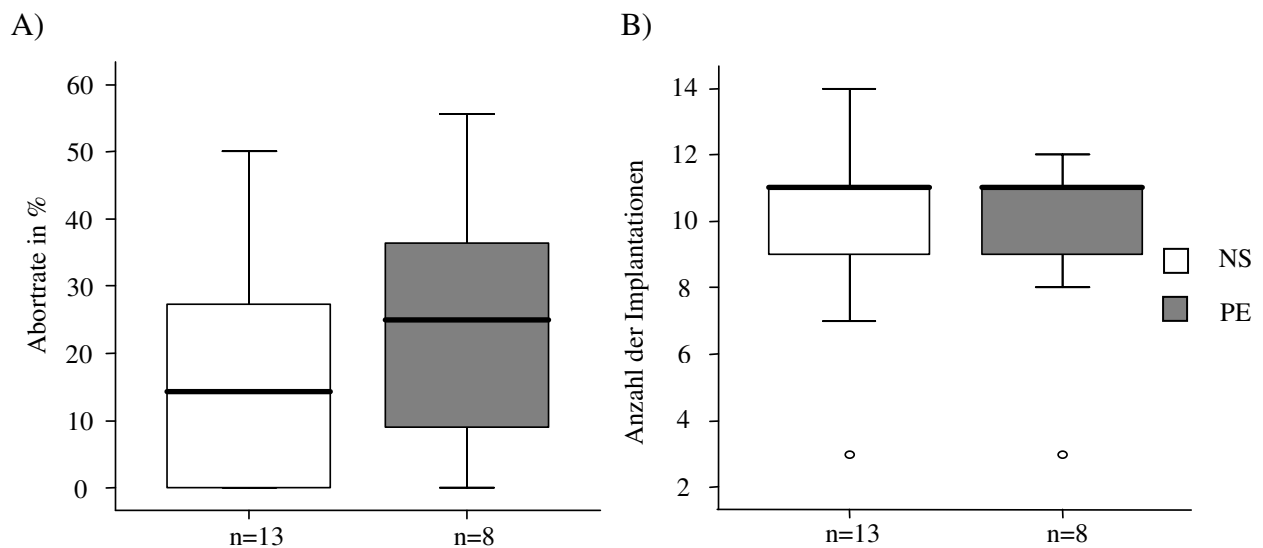


Abbildung 28: Die Daten werden als Box plots (Mediane) dargestellt. A) Abortrate B) Anzahl aller Implantationen zwischen bei normalen Schwangerschaft Mäusen und bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.

### 5.3.2 Blutdruckverlauf bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen

Um untersuchen zu können, ob die Injektion von aktivierten Zellen bei den Mäusen Präeklampsie-ähnliche Symptome auslöst, wurde bei den Mäusen während der gesamten Schwangerschaft der Blutdruck dokumentiert, wobei die Messung des Blutdrucks alle zwei Tage erfolgte. Bereits drei Wochen vor der Verpaarung der Mäuse wurden diese auf die Prozedur des Blutdruckmessens hin trainiert, um zu verhindern, dass durch den Stress der Blutdruckmessung zu hohe Blutdruckwerte gemessen werden. Zum Blutdruckmessen wurde den Mäusen am Schwanz eine Blutdruckmanschette angelegt und der Blutdruck mit Hilfe des Blutdruckmessgerätes von TSE-Systems automatisch bestimmt. Die Messungen wurden 10-mal durchgeführt, um einen geeigneten Mittelwert zu erhalten. Im Verlauf der gesamten Schwangerschaft konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe ein relativ konstanter Blutdruck, der etwa bei 125 mmHg lag, beobachtet werden. Am Ende der Schwangerschaft hingegen

konnte ein Rückgang des Blutdruckes beobachtet werden (Abb. 29). Der Rückgang des Blutdruckes am Ende einer Schwangerschaft ist normal und kann auf das Anwachsen des Embryonen zurückgeführt werden und der damit verbundenen Vergrößerung der Blutgefäße, wodurch es zu einem geringen Blutdruck kommt. Der Blutdruckverlauf der Präeklampsiegruppe war bis zum Tag 10 der Schwangerschaft mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar. Nach der Injektion am Tag 10 und 12 kam es zu einem signifikanten Anstieg des Blutdruckes, der bis zum Ende der Schwangerschaft nicht mehr zurückging (Abb. 29).

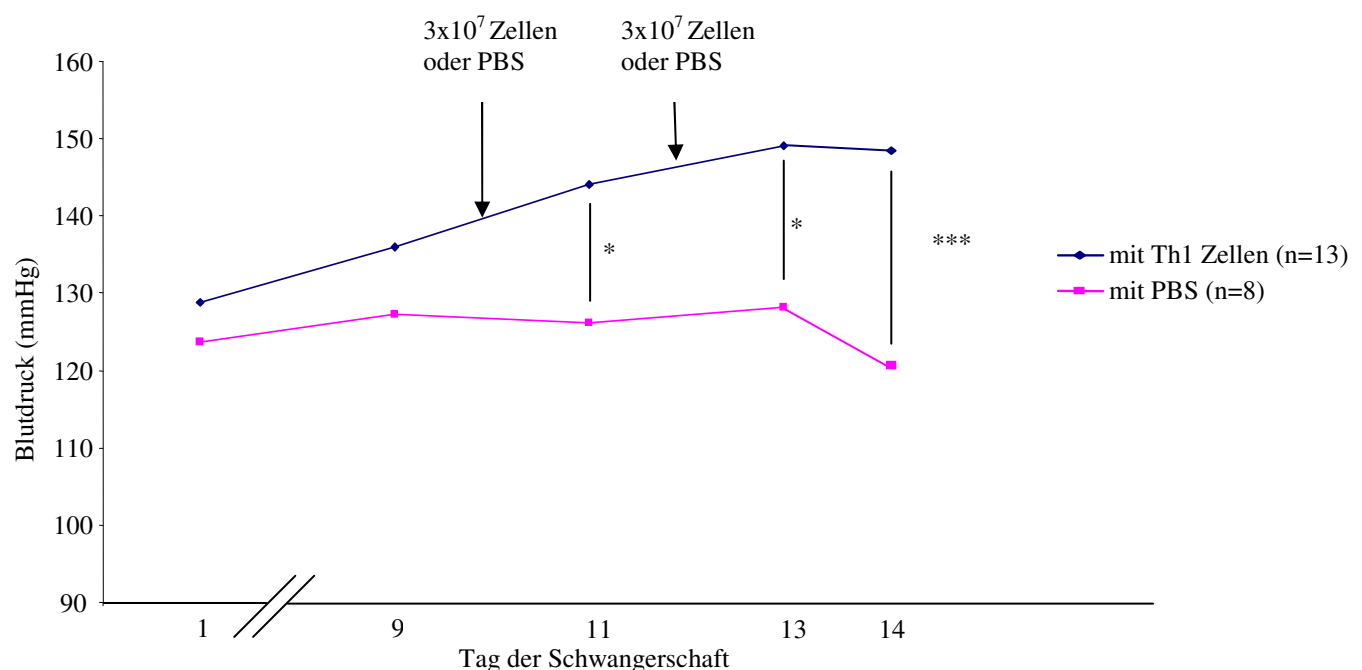


Abbildung 29: Blutdruckverlauf in mmHg der Kontrollgruppe (untere Kurve) im Vergleich mit dem Blutdruckverlauf der Mäuse mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen (obere Kurve). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:  $p < 0,05$  and \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Die Pfeile zeigen Tag 10 und 12 der Schwangerschaft, an denen den Tieren Th1-Zellen bzw. PBS injiziert wurde.

### 5.3.3 Histologische Veränderung in der Niere und der Plazenta bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen

Zur Analyse von möglichen histologischen Veränderungen, die durch die Behandlung mit aktivierten Th1-Zellen auftreten könnten, wurden während der Präparation der Mäuse die Nieren und die Plazenten gewonnen. Die Gewebe wurden anschließend in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Die 5-7µm dicken Schnitte wurden deparaffinisiert und anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun und das Zyotosol mit Eosin gefärbt. Unter dem Mikroskop wurde dann die Histologie der Plazenta und der Niere der Kontrollgruppe (Abb. 30 A und C) mit der

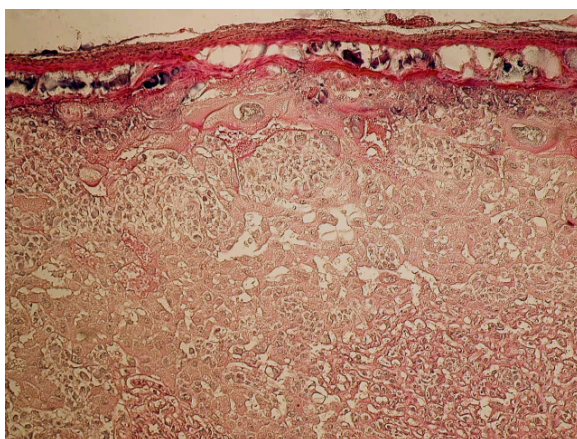
Histologie der Mäuse, die mit aktivierten Th1 Zellen behandelt wurden (Abb. 30 B und D), verglichen. Die Untersuchung zeigte, dass es durch eine Injektion aktivierter Th1 Zellen zu starken Veränderungen in der Plazenta und der Niere kam (Abb. 30 B und D). Sowohl in der Plazenta als auch in den Nieren der Mäuse mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen konnten Hämorrhagien und in der Niere zusätzlich noch eine Desorganisation der Glomerulie beobachtet werden (Abb. 30D).

Die Stärke der Veränderungen wurde beispielhaft für die Plazenta bestimmt. Die Bestimmung erfolgte blind von zwei unabhängigen Beobachtern, wobei drei Kriterien festgelegt wurden, um die Veränderungen zu bestimmen: die Fläche der Hämorrhagien in der Plazenta, die Lymphozyteninvasion in der Plazenta und die morphologischen Veränderungen der Plazenta. Für die Veränderungen wurde eine Skala von 0 bis 6 festgelegt, wobei 0 für keine Hämorrhagie, keine Lymphozyteninvasion und eine normale plazentale Morphologie steht und 6 für die größte Fläche an Hämorrhagien, die massivste Lymphozyteninvasion und stärkste Veränderung der Morphologie.

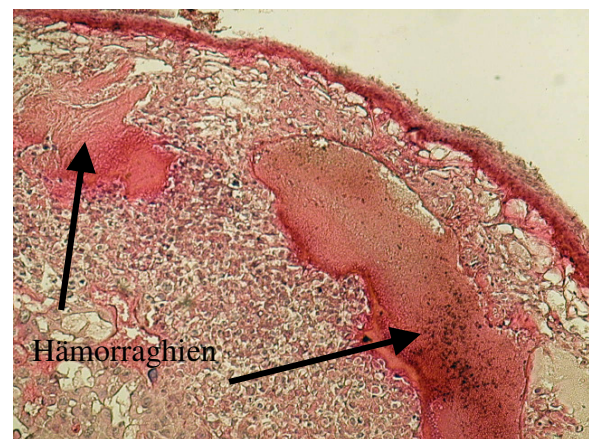
	a) NS (n=7)	b) PE(n=8)
Hämorrhagie	1,00 (*b)	4,00
Lymphozyteninvasion	0,50 (*b)	2,00
Morphologische Veränderungen	0,00 (*b)	2,00

Tabelle XIV: Histologische Veränderungen in der Plazenta A) Normal-schwangere Mäuse B) in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen, dargestellt als Stärke der Veränderungen. Die Daten werden als Median dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:p < 0,05)

A)

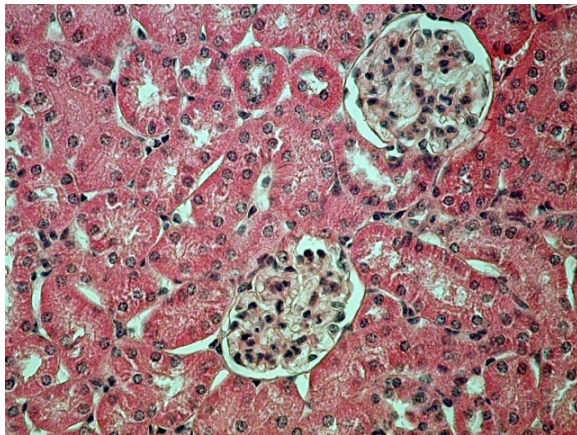


B)





C)



D)

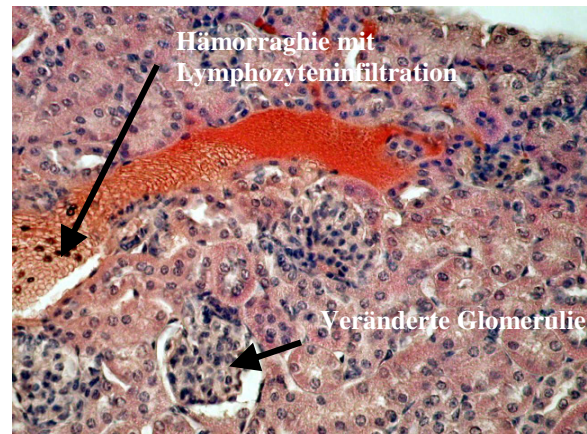


Abbildung 30: HE-Färbungen von A) einer Plazenta aus einer normal-schwangeren Maus B) einer Plazenta aus einer Maus mit präeklampsie-ähnlichen Symptomen C) einer gesunden Niere einer Balb/c Maus. D) einer Balb/c Mausniere, die mit aktivierten Th1-Zellen behandelt wurde, um Präeklampsie-ähnliche Symptome auszulösen. Die Hämorrhagien, Lymphozyteninfiltration und die Desorganisation der Glomerulie in den Geweben werden durch Pfeile markiert.

### 5.3.4 HO Expression in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen

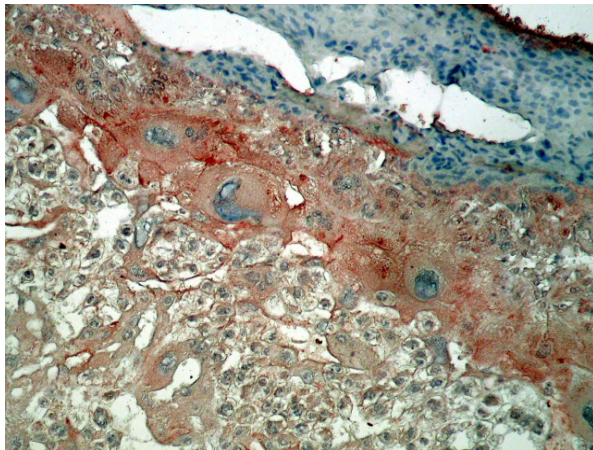
#### 5.3.4.1 HO Expression in plazentalen Zellen

In 5-7µm dicken Plazentaschnitten wurde mittels eines spezifischen HO-1 Antikörpers die Expression von HO-1 in den verschiedenen Zelltypen bestimmt. Die Intensität der Färbung wurde hierbei als Maß für die Expression angesehen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten jedoch keine Unterschiede in der Expressionsrate von HO-1, wenn man die beiden Gruppen miteinander verglich (Tab.XV und Abb. 31).

<i>HO-1</i>	<i>a) NS (n=8)</i>	<i>b) PE (n=6)</i>
Dezidua	0,75	1,25
Riesenzellen	5,5	5,5
Spongiotrophoblasten	1,25	1
Labyrinthzellen	4	4

Tabelle XV: HO-1 Expression in verschiedenen Zelltypen der Plazenta und der Dezidua, dargestellt als Farbintensität der spezifischen Färbung. Die Daten werden als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

A)



B)

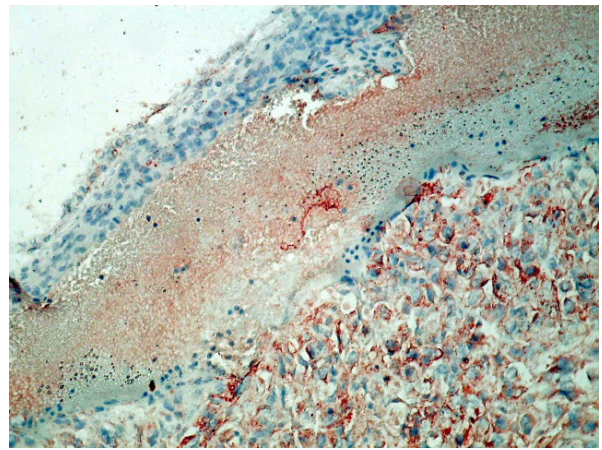
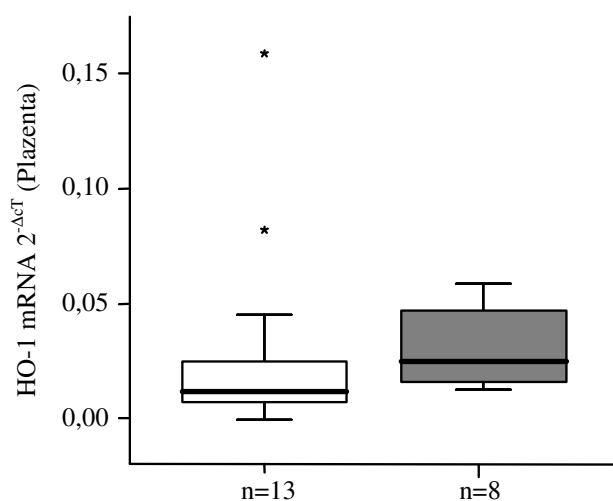


Abbildung 31: Repräsentative HO-1 Färbung in einer A) Plazenta einer normal trächtigen Balb/c Maus und B) einer Balb/c Mausplazenta mit Präeklampsie-ähnliche Symptomen.

#### 5.3.4.2 RT-PCR Analyse von HO-1 in der Plazenta und der Dezidua

Um die HO-1 mRNA zu untersuchen, wurde eine Real-Time RT-PCR durchgeführt. Aus der Plazenta und der Dezidua wurde die RNA gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer HO-1 Primer und Sonde wurde die spezifische Gensequenz von HO-1 amplifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass die mRNA Menge von HO-1 sowohl in der Plazenta (Abb. 32A) als auch in der Dezidua (Abb. 32B) in beiden Versuchsgruppen vergleichbar ist.

A)



B)

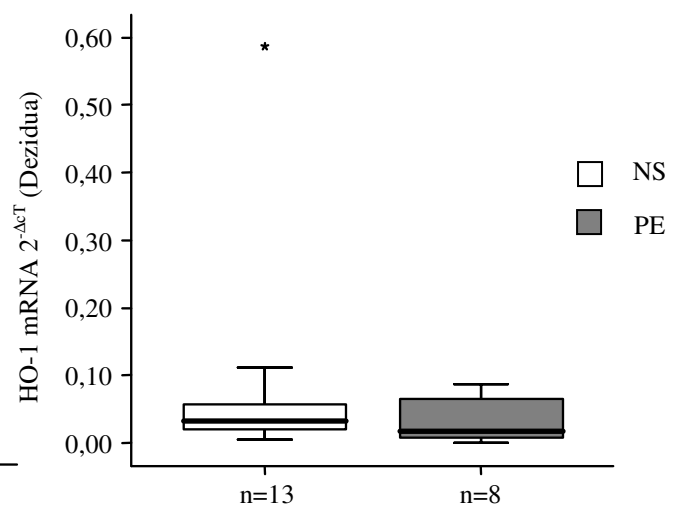
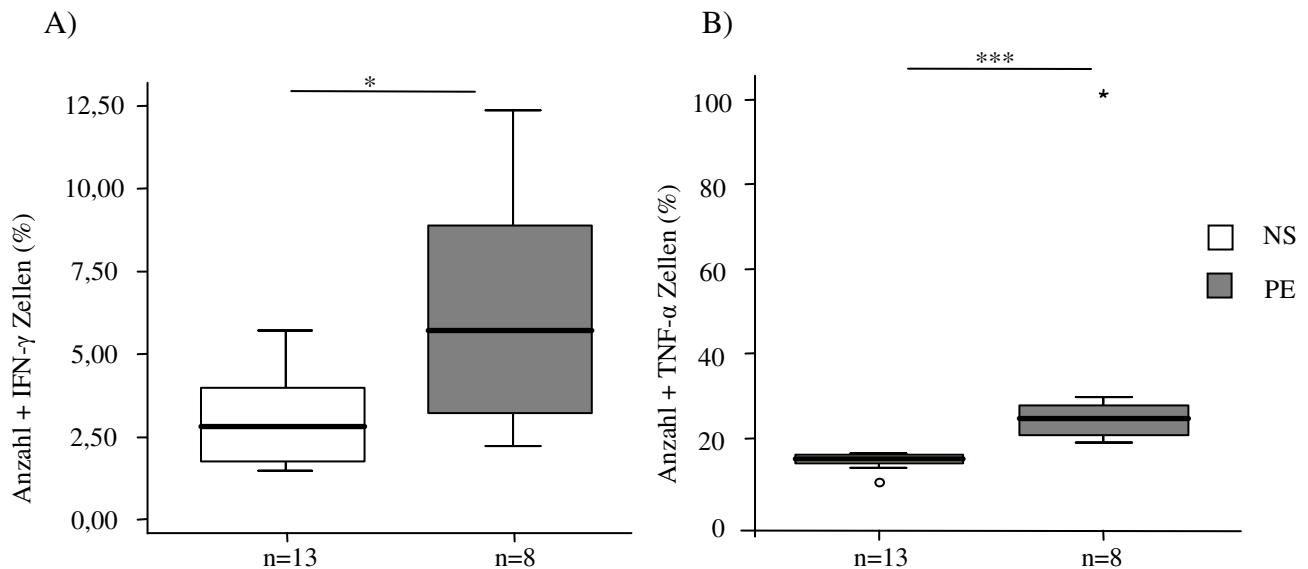


Abbildung 32: Die Daten der HO-1 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  A) in der Plazenta B) in der Dezidua sind als Box plots (Mediane) dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.



### 5.3.5 Th1/Th2 Zytokinproduktion in der Dezidua im Mausmodell für Präeklampsie

Nach der Stimulierung der isolierten Lymphozyten mit Ionomycin und PMA zur Zytokinproduktion wurden die Lymphozyten mit spezifischen, fluoreszierenden Antikörpern markiert und anschließend wurde die Anzahl der positiv gefärbten Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Analyse zeigte, dass der prozentuale Anteil der beiden Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in der Gruppe mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen signifikant erhöht war, im Vergleich zu den normal-schwangeren Mäusen (Abb. 33 A und B). Bei den Th2-Zytokinen IL-10 und IL-4 konnte eine reduzierte Anzahl positiver Zellen in den Präeklampsiemäusen beobachtet werden, die Reduktion war jedoch nicht signifikant (Abb. 33 C und D).



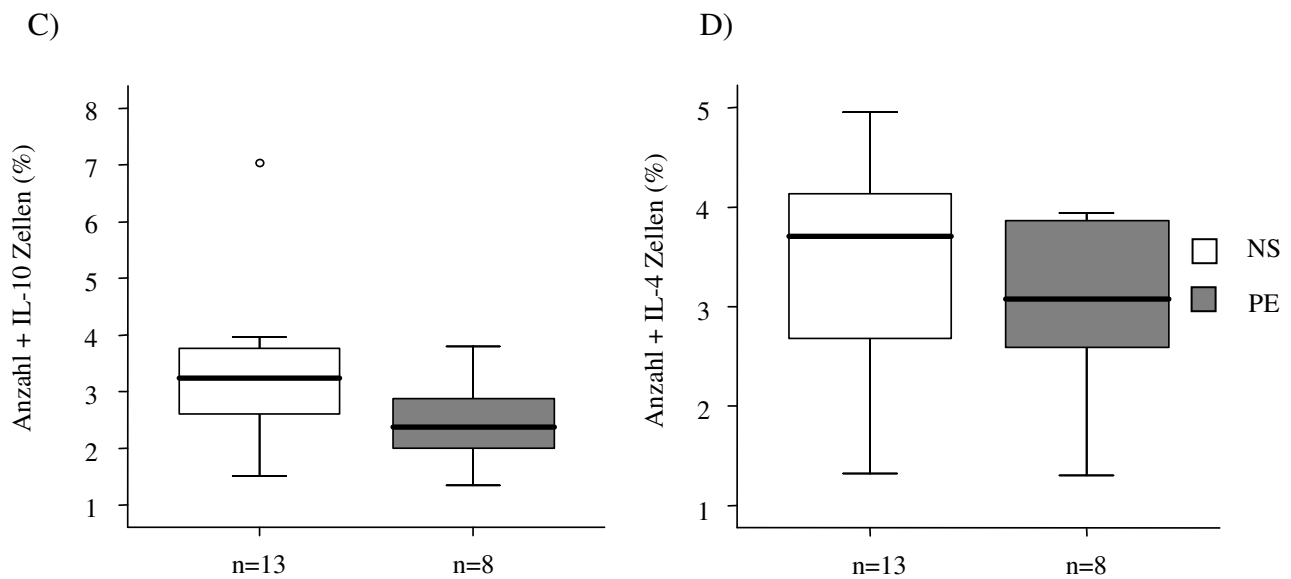


Abbildung 33: Th1/Th2 Zytokine Produktion in der Kontrollgruppe im Vergleich mit den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen. Der prozentuale Anteil der positiven Zellen werden als Box plots (Mediane) dargestellt. A) prozentualer Anteil der IFN- $\gamma$  positiven Zellen B) prozentualer Anteil der TNF- $\alpha$  positiven Zellen C) prozentualer Anteil der IL-10 positiven Zellen und D) prozentualer Anteil der IL-4 positiven Zellen. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des MannWhitney-U Tests (\*:  $p < 0.05$ ) ermittelt.

### 5.3.6 Einfluss einer Co-PP oder Zn-PP Applikation auf den Blutdruckverlauf im Mausmodell für Präeklampsie

Um einen möglichen Einfluss von HO-1 Hoch- oder Runterregulierung bei Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen zu beobachten, wurden diese mit Co-PP, um die HO-1 hoch zuregulieren, oder mit Zn-PP, um die Expression von HO-1 und HO-2 zu reduzieren, behandelt. Die Injektion von Co-PP bzw. Zn-PP erfolgte i.p. am Tag 10 der Schwangerschaft. Die Behandlung der Mäuse führte bei beiden Gruppen gleich nach der Injektion zu einem Anstieg des Blutdruckes, von 116 auf 158 mmHg bei Zn-PP und von 136 auf 168 mmHg bei Co-PP Applikation. Der Blutdruck fiel aber bereits am 12. Tag der Schwangerschaft wieder ab (Abb. 34). Die Tiere die mit Co-PP behandelt wurden, wiesen am Ende der Schwangerschaft einen ähnlich hohen Blutdruck auf, wie die Mäuse die nur mit Th1-Zellen behandelt wurden. Die Tiere, die mit Zn-PP behandelt wurden, zeigten einen stark reduzierten Blutdruck am Ende der Schwangerschaft, der sogar noch unter dem der normal-schwangeren Tiere lag. Das die Applikation mit Co-PP und Zn-PP keinen Einfluss auf den Blutdruck nimmt könnte bedeuten, dass die Hämoxxygenase bei der Ausbildung von Präeklampsie-ähnlichen Symptomen keine Rolle spielt.

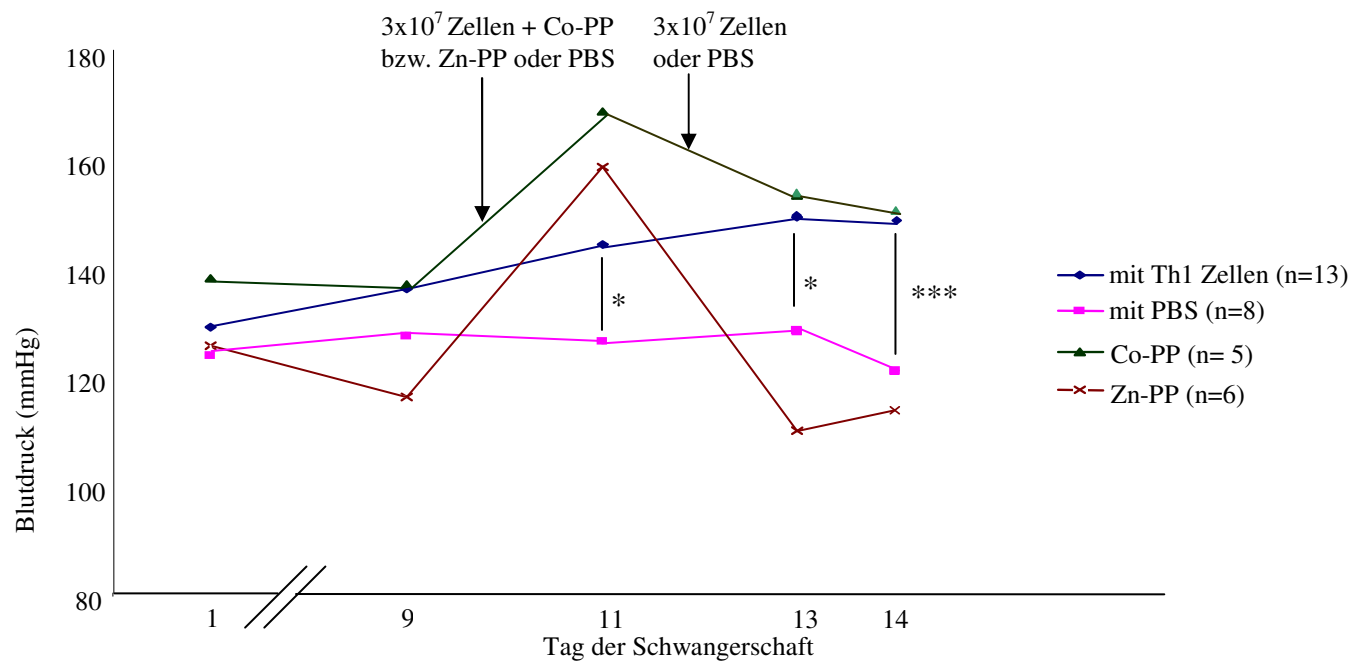


Abbildung 34: Blutdruckverlauf in mmHg der Kontrollgruppe (rosa), der Präeklampsiegruppe (blau), der Gruppe die mit Co-PP behandelt wurde (grün) und der Zn-PP behandelten Mäuse (braun). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests ermittelt (\*:  $p < 0,05$  and \*\*:  $p < 0,001$ ). Die Pfeile zeigen Tag 10 und 12 der Schwangerschaft, an denen den Tieren Th1-Zellen bzw. PBS injiziert wurde.

## 6. Diskussion

Die Schwangerschaft ist ein physiologischer Zustand, bei dem der Fetus von dem Immunsystem der Mutter als Selbst akzeptiert wird, obwohl der Fetus zusätzlich zu den mütterlichen auch väterliche Antigene exprimiert. Der Fetus wird daher als allogenenes Transplantat angesehen, wobei Medawar schon 1953 drei verschiedene Hypothesen aufstellte, um die Akzeptanz der Feten zu erklären.

Dennoch kommt es häufig zu Problemen während der Schwangerschaft, die zum Verlust der Feten führt. Hierzu zählen Uterusfehlbildungen, Myome in der Gebärmutter, Infektionen (wie Röteln oder Toxoplasmose) im Frühstadium der Schwangerschaft, Medikamente, aber auch Genussgifte (Goerke 2002). Eine Fehlgeburt kann aber auch immunologischen Ursprungs sein, bei dem das Immunsystem der Mutter den Fetus als Fremd erkennt und ihn abstößt. Der spontane Abort und die Präeklampsie sind Schwangerschaftskomplikationen, bei denen ein immunologischer Hintergrund besteht.

Beim spontanen Abort wird der Fetus von der Mutter abgestoßen, bevor er selbständig lebensfähig ist (Pschyrembel 2004). Ein großer Anteil der habituellen Aborte kann auf eine unpassende oder falsche Immunantwort zurückgeführt werden (Coulam 1991). Nur selten sind habituelle Aborte auf infektiologische, medikamentöse oder genetische Ursachen zurückzuführen. Die genauen Vorgänge bei einem habituellen Abort sind jedoch bisher weitgehend unbekannt.

Boue und Mitarbeiter (1975) und Stephenson (1996) führen einen einmaligen Abort bei Frauen zu 50% auf chromosomale Anomalien der Zygote zurück. Der spontane Abort würde in solchen Fällen eine Art natürliche pränatale Selektion darstellen und eine abnormale Entwicklung des Feten verhindern.

Die Präeklampsie ist eine hypertensive Erkrankung der Spätschwangerschaft und tritt in der Regel erst nach der 20. Schwangerschaftswoche auf. Bei Frauen mit Präeklampsie kommt es zu einem erhöhten Blutdruck und Proteinurie. Neben thromboembolischen Komplikationen ist die Präeklampsie die häufigste Ursache für die maternale Mortalität.

Eine Vorhersage, ob es im Laufe einer Schwangerschaft zu einer Präeklampsie kommen kann, ist bisher nicht möglich, jedoch sind bestimmte Risikofaktoren bekannt. Schulz und Wacker (2002) sowie Einarsson und Mitarbeiter (2003) konnten nachweisen, dass Frauen, die bis kurz vor der Empfängnis physische Barrieren als Empfängnisverhütung verwendeten, ein höheres Präeklampsierisiko aufwiesen, als Frauen die ungeschützten Sex hatten bzw. medikamentöse Verhütungsmittel verwendeten. Das deutet darauf hin, dass bei Frauen aus einer Partnerschaft

die kurze Kohabitationszeit aufweisen, ein höheres Risiko besteht im Laufe der Schwangerschaft Präeklampsie zu entwickeln.

Die Ergebnisse von Trupin und Mitarbeiter (1996) belegen, dass das Risiko einer Präeklampsie bei Frauen, welche Zweitgebärende sind, stark erhöht ist, wenn die Frau zwischen der ersten und zweiten Schwangerschaft den Partner wechselt und kurz darauf schwanger wird. Bei Frauen mit dem gleichen Partner hingegen sinkt das Risiko einer Präeklampsie bei der zweiten Schwangerschaft.

Bei Autoimmunerkrankungen der Frau besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko einer Präeklampsie. So kommt es bei 25% der Frauen, die an Lupus erythematodes erkrankt sind, zur Ausbildung einer Präeklampsie (Reister und Wagner 2002). Weitere Risikofaktoren sind Diabetes, Frauen mit dem Alter unter 18 und über 40, Frauen mit einem Körpermaßindex über 30 und Mehrlingsschwangerschaften. Die genauen Mechanismen, wie es zu einer Präeklampsie kommt, sind jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Verschiedene Autoren (Ahmed *et al.* 2000, Barber *et al.* 2001, Zenclessen *et al.* 2003) beschrieben bei einer spontanen Fehlgeburt und bei der Präeklampsie eine verminderte Expression der Hämoxygenase (HO), jedoch ist die genaue Rolle von HO bei diesen beiden Schwangerschaftskomplikationen bisher nicht genau geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Rolle der Hämoxygenase in den beiden eben genannten Schwangerschaftskomplikationen genauer untersucht werden.

## **6.1 HO-1 und HO-2 werden am Tag 14 der Schwangerschaft in der Plazenta von Abortmäuse herunterreguliert.**

Um die Rolle von HO bei einem spontanen Abort untersuchen zu können, wurde auf ein bereits etabliertes und anerkanntes Mausmodell für den spontanen Abort zurückgegriffen. Für eine normale Schwangerschaft wurden weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen BALB/c Mäusen verpaart und für den spontanen Abort wurden weibliche CBA/J Mäusen mit männlichen DBA/2J Mäusen verpaart.

Das Modell wurde von Clark und Mitarbeiter (1980) erstmalig beschrieben und es wurde vorgeschlagen, dass die hohen Abortraten in der Verpaarungskombination CBA/J x DBA/2J auf die Unterschiede in den Nebenhistokompatibilitätskomplexen von DBA/2J und BALB/c zurückzuführen sind (Clark *et al.* 1980, Chaouat *et al.* 1988).

Clark und Mitarbeiter (1980) beschrieben, dass die Verpaarung von weiblichen CBA/J Mäusen mit männlichen DBA/2J Mäusen zu Abortraten zwischen 20%-50% führte. Bei der

Verpaarung von CBA/J x DBA/2J konnte in dieser Arbeit eine Abortrate von 20% (Median) beobachtet werden. Die Abortrate war im Vergleich zu der Abortrate der Kontrollgruppe CBA/J x BALB/c, welche bei 0% (Median) lag, signifikant erhöht. Unsere Daten decken sich mit Daten von anderen Autoren weltweit (Clark *et al.* 1980, HO *et al.* 1994, Gorivodsky *et al.* 1998, Zenclussen *et al.* 2002), wobei die Höhe der Abortrate von der Art der Tierhaltung abhängig ist.

Um zu analysieren, ob es zwischen den Abortmäusen und den normal-schwangeren Mäusen einen Unterschied in der HO-1 und HO-2 Expression gibt, wurde die Proteinexpression von HO-1 und HO-2 in der Plazenta und der Dezidua beider Gruppen untersucht.

Die Immunhistochemische Analyse von HO-1 und HO-2 zeigte, dass sowohl in der Abortgruppe als auch in der Kontrollgruppe im Zytoplasma aller Zelltypen der Plazenta und im Zytoplasma der Dezidua HO-1 und HO-2 exprimiert wurde. Zenclussen und Mitarbeiter (2002) beschrieben bei Stress- oder Th1-induzierten mit DBA/2J verpaarten CBA/J Weibchen, eine ähnliche Expression von HO-1 und HO-2 in der Plazenta und in der Dezidua, was die Daten dieser Arbeit bestätigt.

In der Ratte hingegen konnte man ausschließlich in Trophoblastenzellen der Plazenta eine Expression von HO-1 und HO-2 beobachten. In der Dezidua konnte keine HO-1 oder HO-2 Expression nachgewiesen werden (Ihara *et al.* 1998).

Auch im Uterus und in der Plazenta des Menschen konnte eine Expression von HO-1 nachgewiesen werden (Acevedo *et al.* 1998, McLean *et al.* 2000, Yoshiki *et al.* 2000). Verschiedene Autoren beschrieben, dass es bei Schwangerschaftskomplikationen zu einer veränderten Expression von HO kommt (Ahmed *et al.* 2000, Wang und Yu 2002, Zenclussen *et al.* 2003). Zenclussen und Mitarbeiter (2003) zeigten, dass die Expression von HO-2 in Frauen mit spontanem Abort im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen stark reduziert war. Daher ist zu vermuten, dass es auch in den CBA/J Weibchen des spontanen Abortmodells zu einer veränderten HO Expression kommt.

Die immunhistochemische Analyse konnte erstmalig zeigen, dass die Expression von HO-1 und HO-2 in allen Trophoblastenzellen, nicht aber in der Dezidua von Abortmäusen, im Vergleich mit den Kontrollmäusen signifikant reduziert war. Ihara und Mitarbeiter (1998) postulierten, dass hauptsächlich die Trophoblasten für den Häm-Metabolismus in der Plazenta verantwortlich sind, was die Daten dieser Arbeit bestätigen würde, da es bei den Abortmäusen ausschließlich in den Trophoblasten zu einer veränderten HO-1 und HO-2 Expression kommt. Mittels Western-Blot-Analyse haben wir weiterhin die HO-1 und HO-2 Konzentration in Gewebe-Homogenisaten der Plazenta semi-quantitativ untersucht. Auch hier zeigte sich in der

Plazenta eine signifikante Reduktion der HO-1 und HO-2 Expression in Abortmäusen, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Bereits Mantovani und Mitarbeiter (1997) beschrieben, dass zu geringe Mengen an HO für das Gewebe an der feto-maternalen Grenze schädlich sind, da es zu einer vermehrten Ansammlung von freiem Häm kommt, welches *per se* giftig ist und gewebeschädigende Eigenschaften aufweist (Balla *et al.* 1991, 1993, 2003). Die erhöhten Abortraten sind möglicherweise auf zu viel freies Häm zurückzuführen. Zenclussen und Mitarbeiter (2002) postulierte hierzu folgendes Szenario: Durch die geringe Konzentration von HO an der feto-maternalen Grenze wird freies Häm unzureichend abgebaut. Als Folge dessen kommt es zur Schädigung von Endothelzellen und zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen in diesen Zellen, was zu einer erhöhten Menge an Th1-Zellen führt. Durch die erhöhte Anzahl an Th1-Zellen kommt es zu weiteren oxidativen Schäden.

Durch die geringere Expression von HO-1 und HO-2 kommt es zudem zu einer verminderten Bildung von CO, Bilverdin und freiem Eisen, welche beim Abbau von Häm entstehen. Allen drei Metaboliten werden schützende Eigenschaften nachgesagt (Stocker *et al.* 1987, Marks 1991, Sato *et al.* 2001, Vedernikov *et al.* 1989), sodass auch hier ein Grund für die erhöhten Abortraten zu suchen wäre. Diese Hypothese würde bedeuten, dass die verminderte Expression von HO-1 die Ursache für den erhöhten Abort ist und könnte somit genetischen Ursprungs sein. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe (Wollenberg *et al.* in Vorbereitung) nachweisen, dass DBA/2J Männchen in den Testis höhere HO-1 mRNA Werte aufweisen als BALB/c Männchen. Die F1 Generation der Verpaarung weiblicher CBA/J mit männlichen DBA/2J könnte somit eine genetisch bedingte verminderte HO-1 Expression aufweisen, die zu den hohen Abortraten führt. Weiterhin beschrieben Denschlag und Mitarbeiter (2004), dass HO-1 die Ursache für den Abort sein kann. Die Autoren zeigten, dass es bei Frauen mit einem habituellen Abort zu einem Polymorphismus des HO-1 (GT)<sub>n</sub> Mikrosatelliten kommt, was zu einer verminderten HO-1 Expression führte.

Es muss jedoch noch geklärt werden, ob die verminderte Expression von HO-1 die Ursache oder die Konsequenz des murinen Abortes ist. Ist die reduzierte HO-1 Expression die Ursache des Abortes, so könnte man postulieren, dass eine Induktion der HO-1 den Feten vor einem spontanen Abort schützen kann.

## **6.2 Erhöhte Th1/Th2 Ratio in der Dezidua von Mäusen mit spontanem Abort im Vergleich zu normal-schwangeren Mäusen am Tag 14 der Schwangerschaft.**

Erfolgreiche Schwangerschaften wurden mit einer erhöhten Th2-Zytokinproduktion in Verbindung gebracht (Lin *et al.* 1993, Joachim *et al.* 2002). Die Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind aber bisher in der Reproduktionsimmunologie nicht geklärt. Zur Analyse der Th1- und Th2-Zytokinproduktion in T-Zellen aus der Milz und der Dezidua wurden die T-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Analyse der Daten zeigte, dass wenn man die einzelnen Zytokine untersucht, es weder systemisch noch lokal zu einer veränderten Zytokinproduktion in Abortmäusen im Vergleich mit den Kontrollmäusen kommt. Bei der Analyse der Th1/Th2 Ratio zeigte sich, dass es in der Dezidua der Abortmäuse zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio kam. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man vermuten, dass es bei einem Abort zu einer verminderten Th2 Antwort kommt, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt. Die Studien zeigten, dass ein spontaner Abort durch eine verminderte Th2-Zytokinproduktion und erhöhte Mengen von Th1 Zytokine charakterisiert war (Haimovici *et al.* 1991, Piccinni *et al.* 1998, Raghupaty *et al.* 2000, Zenclussen *et al.* 2003).

In der Transplantationsimmunologie konnte nachgewiesen werden, dass eine veränderte HO-1 Expression einen Einfluss auf die Th1/Th2-Zytokinproduktion hat. Eine erhöhte Expression an HO-1 führte bei Nierentransplantaten zu einer verminderten Th1 Zytokinproduktion (Tullius *et al.* 2002). Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Woo und Mitarbeiter (2000) im Mausmodell für graft-versus-host-disease (GVHD) machen, wo es nach einer erhöhten HO-1 Produktion zu einer verminderten IFN- $\gamma$  Produktion kam. Ke und Mitarbeiter (2000) konnten beweisen, dass eine erhöhte Th2-Zytokinproduktion bei Herztransplantationen in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von HO-1 steht.

Da der Fetus als intrauterines Allotransplantat angesehen wird, kann man vermuten, dass es im Laufe der Schwangerschaft ähnlich wie bei der Akzeptanz von Transplantaten zu einer Interaktion zwischen HO-1 und der Th1/Th2-Zytokinproduktion kommt. So konnten Acevedo und Mitarbeiter (1998) zeigen, dass es im Laufe einer normalen Schwangerschaft, welche mit einer erhöhten Th2-Zytokinproduktion in Verbindung gebracht wird (Lin *et al.* 1993, Joachim *et al.* 2002), zu einem signifikanten Anstieg der HO-1 Expression kommt. Bei Schwangerschaftskomplikationen hingegen, welche mit einer erhöhten Th1-Zytokinproduktion assoziiert wird (Lin *et al.* 1993, Clark *et al.* 1999), konnte ein signifikanter



Rückgang der HO-1 Expression beobachtet werden (Ahmed *et al.* 2000, Zenclussen *et al.* 2003).

### **6.3 In Abortmäusen kommt es in der Plazenta und der Dezidua zu einer verminderten Expression von iNOS und eNOS am Tag 14 der Schwangerschaft**

Verschiedene Autoren postulierten eine Wechselwirkung zwischen dem NOS-System und dem HO-System (White und Marletta 1992, McMillan *et al.* 1992, Wang *et al.* 1994, Maines 1997, Datta *et al.* 2002). Stickstoff scheint besonders zu Beginn der Schwangerschaft eine Rolle zu spielen. Zu diesem Zeitpunkt kommt es durch erhöhte Mengen von NO zu einer Entspannung der glatten Muskulatur und des Myometriums, was eine Implantation der Blastozyste erleichtern sollte (Purcell *et al.* 1999). Aber auch am Ende der Schwangerschaft scheint NO eine wichtige Rolle zu spielen (Sladek *et al.* 1997, Purcell *et al.* 1999, Chwalisz und Garfield 2000). Die Expression von iNOS und eNOS in der Plazenta konnte in verschiedenen Spezies beobachtet werden (Casado *et al.* 1997, Myatt *et al.* 1997, Purcell *et al.* 1997, Purcell *et al.* 1999). Purcell und Mitarbeiter. (1999) konnten innerhalb des Implantationsfensters in der Maus die Expression von iNOS und eNOS beobachten, was vermuten lässt, dass NOS und NO vor und während der Implantation in der Maus eine Rolle spielen. Die Ergebnisse von Gaglioti und Mitarbeiter (2000) belegten, dass bei 3,5 Tage alten murinen Blastozysten, aber auch in Blastozysten, die 72 Stunden in Kultur gehalten worden waren, kein iNOS oder eNOS exprimiert wird. Dies würde bedeuten, dass die von Purcell und Mitarbeiter (1999) beobachteten iNOS und eNOS Expression nicht vom Blastozysten selbst ausgeht, sondern durch andere zelluläre Quellen erfolgt. Weiterhin zeigten Purcell und Mitarbeiter, dass iNOS und eNOS in Trophoblasten am Tag 7,5 der Schwangerschaft exprimiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass am Tag 14 der Schwangerschaft iNOS und eNOS in allen Zelltypen der Plazenta und der Dezidua exprimiert werden.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse konnte jedoch nur eine schwache Färbung gezeigt werden, was auf geringe Protein-Mengen an NOS am 14. Tag der Schwangerschaft hindeutet. Die Ergebnisse decken sich mit den Studien von Casado und Mitarbeiter (1997) und Gaglioti und Mitarbeiter (2000). Diese Autoren wiesen in der Plazenta von Ratten nur sehr geringe Mengen an iNOS und eNOS nach. Weiterhin konnten Gaglioti und Mitarbeiter (2000) zeigen, dass am Tag 7,5 der Mausschwangerschaft die iNOS und eNOS-Expression von Riesenzellen sehr schwach waren, was ebenfalls auf geringe Protein-Mengen von iNOS und

eNOS hinweist. Die Untersuchung von iNOS und eNOS in der Plazenta und der Dezidua mittels Western-Blot-Analyse bewies im Rahmen dieser Arbeit, dass es in den Tieren mit einer erhöhten Abortrate zu einer verminderten Expression von iNOS und eNOS kommt. Urban und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass in Dezidua- und Trophoblastenzellen von Frauen mit einem spontanen Abort im Vergleich zu Frauen, die die Schwangerschaft künstlich abbrechen, die Expression von iNOS vermindert war. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von iNOS, besonders für den Zeitraum der Implantation, eine wichtige Rolle spielt.

Ein spontaner Abort beim Menschen beendet meist die Schwangerschaft, da bei der humanen Schwangerschaft im Durchschnitt nur ein Fetus ausgetragen wird. Mäusen hingegen tragen durchschnittlich 6-8 Feten aus. Aufgrund der hohen Anzahl der Feten kommt es nach einem Abort in der Maus nicht zu einem Abbruch der Schwangerschaft. Die Aborte werden von der trächtigen Maus resorbiert und der verblieben gesunden Feten werden ausgetragen.

Man könnte somit postulieren, dass die verminderte Expression von iNOS und eNOS, die am Tag 14 der Schwangerschaft in Abortmäusen beobachtet wurde, bereits während dem Zeitraum der Implantation einen Einfluss auf die Abortrate in den Mäusen haben könnte.

Lyouni und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass die Hemmung von NOS bei akuten Entzündungsreaktionen zu einer Verminderung der HO-1 mRNA in der Leber führt. Die Autoren postulierten, dass in der Leber von Ratten der cGMP-Signalweg die HO-1 mRNA Expression kontrolliert. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, wo es in der Plazenta von Abortmäusen sowohl zu einer Reduktion von iNOS und eNOS als auch zu einer Verminderung der HO-1 und HO-2 Expression kam. Somit könnte in der Plazenta von Abortmäusen, in Anlehnung an die Theorie von Lyouni und Mitarbeiter (1998), HO durch den cGMP-Signalweg und somit über die Expression von NOS kontrolliert werden.

#### **6.4 Die Behandlung mit Co-PP reguliert HO-1 hoch und führt zu verminderten Abortraten**

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass trächtige CBA/J Mäuse der Abortgruppe (mit DBA/2J verpaart) in der Plazenta signifikant weniger HO-1 und HO-2 exprimieren, als die Kontrollgruppe (siehe 6.1.2) und es wurde postuliert, dass eine erhöhte HO-1 Expression den Feten vor einem Abort schützen könnte.

Bei Nierentransplantationen in der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von HO-1, welche durch eine Behandlung mit Co-PP erreicht wurde, eine frühe inflammatorische Reaktion gegen das Transplantat stark verminderte und so die chronische Abstoßung der Transplantate verhinderte (Tullius *et al.* 2002). Martins und Mitarbeiter (2005) beschrieben in dem gleichen Transplantationsmodell, dass es in den dendritischen Zellen durch die erhöhte Expression von HO-1 zu einer verringerten Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch zu einer verminderten Expression von MHC Klasse II Antigenen kommt. In Lebertransplantationen führte die Behandlung mit Co-PP ebenfalls zu einer verbesserten Akzeptanz des Transplantates (Kato *et al.* 2001, Redaelli *et al.* 2002). Bei Herztransplantationen in der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Expression von HO-1, die durch eine Co-PP Applikation induziert wurde, durch die Zugabe von Zn-PP, einem Inhibitor von HO-1 und HO-2, wieder reduziert werden konnte (Katori *et al.* 2002). Dies führte zu einer verminderten Akzeptanz des Transplantates. Tullius und Mitarbeiter (2002) beschrieben ebenfalls nach der Behandlung mit Zn-PP eine verminderte HO-1 Expression in Mäusen mit Nierentransplantaten.

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit Co-PP oder Zn-PP einen ähnlich schützenden bzw. negativen Effekt auf die Abortrate hat wie auf Transplantate, wurde das murine Abortmodell verwendet.

Die immunhistochemische Analyse (IHC) zeigte, dass HO-1 und interessanterweise auch HO-2 in den Trophoblastenzellen der Co-PP behandelten Tiere signifikant hochreguliert waren. Co-PP wurde bisher nur als Induktor von HO-1 beschrieben (Kato *et al.* 2001, Redaelli *et al.* 2002, Tullius *et al.* 2002), sodass keine erhöhte Expression von HO-2 zu erwarten war, da HO-2 konstitutiv exprimiert wird. Zenclussen und Mitarbeiter (2002 und 2003) beobachteten in der Plazenta von schwangeren Frauen mit spontanem Abort und in Mäusen mit einem Th1 induzierten oder durch Stress ausgelösten Abort verringerte Mengen an HO-2. Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass HO-2 in der Plazenta nicht nur konstitutiv exprimiert wird, was auf eine schützende Funktion dieses Moleküls an der feto-maternalen Grenze hindeuten könnte. Weiterhin zeigte die IHC Analyse, dass es in der Dezidua zu keiner veränderten Expression von HO-1 und HO-2 nach der Behandlung mit Co-PP kommt. Dies lässt vermuten, dass die Dezidua beim Häm-Metabolismus an der feto-maternalen Grenze und bei der Ausbildung eines Abortes keine Rolle spielt. Die Western-Blot-Analyse zeigte ebenfalls, dass die Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP in der Plazenta zu einer signifikant erhöhten Expression von HO-1 und HO-2 führt. Bei der RT-PCR Analyse

hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der HO-1 mRNA zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden.

Die Behandlung mit Co-PP führte zu einem signifikanten Rückgang der Abortrate im Vergleich zu der Abortkontrollgruppe. Aufgrund der bisherigen Daten, kann der Rückgang der Abortrate in dieser Gruppe direkt auf eine erhöhte Expression von HO-1 und HO-2 zurückgeführt werden.

Ähnliche Beobachtungen konnten in einem anderen experimentellen Ansatz unserer Arbeitsgruppe gemacht werden, indem die Behandlung von Abortmäusen mit dem Adenovirus AdHO-1/GFP zu einer signifikanten Reduktion der Abortrate führte.

Dies bestätigt, dass die HO-1 Hochregulation den Fetus vor einem spontanen Abort schützen kann.

Die Behandlung mit Zn-PP, einem HO-1 und HO-2 Hemmer, führte zu einer stark erhöhten Abortrate. Somit konnte in dieser Arbeit abermals gezeigt werden, dass eine verringerte Expression von HO-1 nicht mit einer erfolgreichen Schwangerschaft in Verbindung gebracht werden kann. Anders als durch die Hypothese erwartet, konnte man jedoch am Tag 14 der Schwangerschaft in den Zn-PP behandelten Tieren im Vergleich zu der normalen Abortgruppe, keine reduzierten Mengen an HO-1 und HO-2 beobachten. Im Gegenteil, sowohl die immunhistochemische Analyse als auch die Western-Blot Analyse zeigten in der Plazenta erhöhte Mengen an HO-1 und HO-2.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen erbrachten Rodgers und Mitarbeiter (1996). Die Autoren beschrieben, dass die Hemmung der HO-Aktivität durch eine Zn-PP-Behandlung in neugeborenen Ratten nur 1-4 Tage anhielt und anschließend wieder anstieg.

Das untersuchte plazentale Gewebe stammte vom Tag 14 der Schwangerschaft, d.h. 10 Tage nach der Zn-PP-Behandlung. Die erhöhten Mengen an HO-1 und HO-2 am 14ten Tag der Schwangerschaft könnten dadurch erklärt werden, dass das Immunsystem der Tiere nach Ablauf der Wirkung von Zn-PP begann, die negativen Effekte der Zn-PP-Behandlung mit einer Erhöhung der HO-Expression wieder zu neutralisieren.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden einige der behandelten Tiere bereits am Tag 8 der Schwangerschaft, also 4 Tage nach der Behandlung mit Zn-PP, getötet und in der Plazenta die HO-1 Expression untersucht.

Am Tag 8 der Schwangerschaft ist die Entwicklung der Plazenta noch nicht vollständig abgeschlossen und unterscheidet sich daher morphologisch von einer Plazenta am Tag 14. Die Immunhistochemische Analyse des plazentalen Gewebes vom Tag 8 der Schwangerschaft ergab keine HO-1 Expression in dem Gewebe. Da jedoch verschiedene Autoren im Laufe der

gesamten Schwangerschaft eine Expression von HO-1 und HO-2 beschrieben haben (Ihara *et al.* 1998, Odrich *et al.* 1998 Lyall *et al.* 2000), deutet das Ergebnis eher auf technische Probleme hin, als das bei den Tieren kein HO exprimiert wird. Bei der Western-Blot Analyse konnte man ebenfalls aufgrund technischer Probleme kein HO nachweisen, daher konnte die Expression von HO-1 am Tag 8 der Schwangerschaft nur durch eine mRNA Analyse untersucht werden.

Die mRNA Analyse von HO-1 in placentalem Gewebe vom Tag 8 der Schwangerschaft, also 4 Tage nach der Behandlung mit Co-PP bzw. Zn-PP, zeigte leicht verminderte, aber nicht statistisch signifikante Mengen an HO-1 mRNA in den Tieren, die mit ZnPP behandelt wurden im Vergleich zu der Abortkontrollgruppe. Die Menge an HO-1 mRNA in den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden, ist dagegen erhöht.

Die Menge an HO-1 mRNA am Tag 8 der Schwangerschaft war zwar nicht signifikant reduziert, dennoch bestätigen diese Daten die aufgestellte Hypothese. Nach dem Abklingen der Hemmung von HO-1 und HO-2, induziert durch eine Behandlung mit Zn-PP, versucht das Immunsystem der Tiere durch eine erhöhte Expression von HO den negativen Effekten der Behandlung entgegenzuwirken.

Die Analyse der HO-1 und HO-2 Expression lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass zum einen eine erhöhte Expression von HO im Laufe der Schwangerschaft den Fetus vor einem spontanen Abort schützt und zum anderen, dass reduzierte Mengen von HO schädlich für das Überleben des Feten sind und einen spontanen Abort fördern. Im Folgenden werden mögliche Mechanismen anhand von Ergebnissen diskutiert.

#### **6.4.1 Der therapeutische Effekt von Co-PP scheint nicht durch eine Veränderung der Th1/Th2/Th3 Antwort induziert zu werden**

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der spontane Abort, welcher in der Plazenta durch eine stark verminderte HO-1 Expression am Tag 14 der Schwangerschaft gekennzeichnet ist, durch eine erhöhte TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio charakterisiert (siehe 6.1.1).

Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Behandlung mit Co-PP zu einer erhöhten Expression von HO-1 und zu einer verminderten Abortrate führt. Es ist bisher jedoch unklar, wie sich die Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP auf die Th1 und Th2-Zytokinproduktion auswirkt.

Die Analyse der Th1/Th2 Ratio zeigte diesmal jedoch keine signifikanten Unterschiede in der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio zwischen der Abortgruppe und der normalen Schwangerschaftsgruppe,

sondern nur die Tendenz einer verminderten Ratio. Dies könnte auf die kleinere Anzahl an Proben zurückzuführen sein, die mittels Durchflusszytometrie untersucht wurden.

Um zu untersuchen, ob der durch die CO-PP-Behandlung induzierte HO-1 vermittelte Schutz einen Einfluss auf die Immunantwort hat, wurden nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin in den Lymphozyten der Milz und der Dezidua die Th1 Zytokine INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die Th2 Zytokine IL-4 und IL-10 untersucht.

Interessanterweise zeigte die Analyse der Daten, dass die Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP im Vergleich mit der Abortkontrollgruppe oder der normal-schwangeren Gruppe zu keiner veränderten Th2-Zytokinproduktion führt. Die verminderte Abortrate in den Mäusen, die mit Co-PP behandelt wurden, kann durch eine HO-1 induzierte Th2 Antwort erklärt werden.

Die Untersuchung der Th1-Zytokinproduktion ergab ebenfalls keine Unterschiede in den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden im Vergleich zu normal-schwangeren Mäusen oder PBS-behandelten Abortmäusen. Die Analyse der TNF- $\alpha$  mRNA mittels RT-PCR zeigte, dass in den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden, eine erhöhte Menge an TNF- $\alpha$  mRNA sowohl am Tag 8 als auch am Tag 14 der Schwangerschaft im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden konnte. Die Daten dieser Arbeit stehen somit im Gegensatz zu den von Tullius und Mitarbeiter (2002) beschriebenen Beobachtungen, dass es nach der Behandlung mit Co-PP bei Mäusen mit Nierentransplantaten zu einem Rückgang der TNF- $\alpha$  Produktion kommt. Die Daten deuten darauf hin, dass die Behandlung mit Co-PP in dem Pre-implantationsfenster zwar zu einer erhöhten Expression von HO-1 führt, aber nicht zu einer verminderten Th1/Th2 Zytokinproduktion. In einer Studie von M. Zenclussen und Mitarbeiter (2006) konnte nachgewiesen werden, dass CBA/J Weibchen, die nach einer Verpaarung mit DBA/2J Männchen mit dem Adenoviruskonstrukt AdHO-1/GFP behandelt wurden, reduzierten Abortraten aufweisen. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die HO-1 Hochregulation zu einer erhöhten Th2-Zytokinproduktion in der Milz und in der Dezidua führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen somit im Gegensatz zu denen von M. Zenclussen und Mitarbeiter (2006). Eine Erklärung für die unterschiedliche Th2-Zytokinproduktion könnte die Art der HO-1 Induktion darstellen. Bei der HO-1 Gentherapie (M. Zenclussen *et al.* 2006) kommt es ausschließlich zu einer HO-1 Induktion. Somit kann nur die veränderte HO-1 Expression einen Einfluss auf die Zytokinproduktion nehmen. Bei der Co-PP-Applikation handelt es sich um eine therapeutische Behandlung, bei der neben HO-1 auch andere Moleküle beeinflusst werden. Daher ist davon auszugehen, dass auch andere Moleküle aktiviert oder gehemmt werden, die einen Einfluss auf die Zytokinproduktion haben.

Eine weitere Möglichkeit, wie eine erhöhte HO-1 Expression Einfluss auf das Immunsystem der trächtigen Tiere nehmen könnte, wären die Th3-Zytokine, z.B. TGF- $\beta$ . Die Analyse von TGF- $\beta$  erfolgte ausschließlich mittels RT-PCR. Die mRNA Analyse von TGF- $\beta$  zeigte, dass am Tag 14 der Schwangerschaft die mit Co-PP behandelten Tiere keine Unterschiede in der TGF- $\beta$  mRNA Menge im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufwiesen. Daher ist zu vermuten, dass TGF- $\beta$  auf die verminderte Abortrate keinen Einfluss hat. Die Regulation von TGF- $\beta$  erfolgt jedoch auch posttranskriptional, z.B. durch Steroide (Kim *et al.* 1994), wodurch aufgrund der vorhandenen Daten nicht ausgeschlossen werden kann, dass TGF- $\beta$  doch einen Einfluss auf die Abortrate hat. Darüber hinaus zeigten Dunker und Kriegelstein (2002), dass TGF- $\beta$  für das Überleben der Embryonen absolut notwendig ist.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es trotz einer erhöhten Th1-Zytokinproduktion zu einer verminderten Abortrate kommt, was gegen das starre Th1/Th2 Paradigma spricht.

Die Behandlung von Abortmäusen mit Zn-PP führte zu hohen Abortraten. Interessanterweise konnte man aber in diesen Tieren in der Milz und in der Dezidua eine verminderte Menge an IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beobachten. Auch die Analyse der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio zeigte einen Rückgang der Ratio in den Tieren, die mit Zn-PP behandelt wurden. Bates (2002) beschrieb zwar im Zusammenhang mit habituellen Aborten bei Frauen eine verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion, doch konnte er, anders als in dieser Arbeit, erhöhte Mengen an Th2-Zytokinen beobachten. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen somit im Widerspruch zu den meisten anderen Studien, die bei spontanen Aborten erhöhte Mengen von Th1-Zytokine oder ein Ungleichgewicht der Th1/Th2 Ratio beobachten konnten (Lin *et al.* 1993, Wegmann 1993).

Die Studien von Rodgers und Mitarbeiter (1996) belegen, dass die Wirkung von Zn-PP nach der Behandlung in der Leber von neugeborenen Ratten 1-4 Tage anhält, somit könnte die am Tag 14 der Schwangerschaft beobachtete Immunantwort eine indirekte Folge der Zn-PP Behandlung sein, ähnlich wie es bereits im Zusammenhang mit der leicht erhöhten HO-1 Expression in den Abortmäusen, die mit Zn-PP behandelt wurden (siehe 6.1.4), postuliert wurde. Die verminderte Expression von Th1-Zytokinen könnte eine Reaktion des Immunsystems der Mäuse auf die Zn-PP-Behandlung sein, um so den negativen Auswirkungen der Applikation entgegenzuwirken. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Th1/Th2-Zytokinproduktion am Tag 8 der Schwangerschaft, also 4 Tage nach der Behandlung mit Zn-PP, analysiert.

Die TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Mengen in der Milz der Tiere, die mit Zn-PP behandelt wurden, zeigten am Tag 8 der Schwangerschaft keinen Unterschied zu den Kontrollmäusen. Die

Analyse der TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio zeigte am Tag 8 der Schwangerschaft eine Tendenz zu einer verringerten Th1/Th2-Ratio in den Tieren, die mit Zn-PP behandelt wurden. Die Analyse der TNF- $\alpha$  mRNA mittels RT-PCR zeigte am Tag 8 der Schwangerschaft ebenfalls reduzierte mRNA Mengen an TNF- $\alpha$  in den Tieren, die mit Zn-PP behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Immunsystem der Mäuse sehr schnell auf die Zn-PP Applikation reagiert.

Eine Analyse des Th3-Zytokins TGF- $\beta$  zeigte am Tag 14 der Schwangerschaft einen signifikanten Anstieg der TGF- $\beta$  mRNA in den Tieren, die mit Zn-PP behandelt wurden. Man könnte somit auch hier vermuten, dass das Immunsystem der Maus auf die Behandlung mit Zn-PP reagiert und dessen negative Effekte mittels erhöhter Mengen an TGF- $\beta$  mRNA neutralisiert. Da TGF- $\beta$  aber hauptsächlich posttranskriptional reguliert wird, ist eine genaue Aussage über die Funktion von TGF- $\beta$  nicht möglich und es sollte eine Analyse der TGF- $\beta$  Proteinexpression folgen.

Die Daten zeigen, dass es trotz erhöhter Abortraten zu einer erhöhten Th2-Zytokinproduktion kommen kann, was dem Th1/Th2/Th3 Paradigma widerspricht.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen zudem vermuten, dass bei einer Co-PP Applikation andere Faktoren als HO-1 einen Einfluss auf die Th1/Th2-Ratio haben und dass die verminderte Abortrate in diesen Tieren nicht mit den Veränderungen der Th1/Th2/Th3-Zytokinproduktion zusammenhängt.

#### **6.4.2 Eine erhöhte HO-1 Expression nimmt keinen Einfluss auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen**

Einen wichtigen Toleranz-Mechanismus in der Transplantationsimmunologie und auch während der Schwangerschaft stellen die regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) dar (Zenclussen 2006). Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen spielen bei der Unterdrückung einer Immunantwort gegenüber Fremdan antigenen und bei der Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen eine zentrale Rolle. Sie sind daher in der Lage, immunpathologische Antworten, wie sie bei Autoimmunkrankheiten oder Allergien auftreten, zu hemmen und sind an der Akzeptanz von Transplantaten beteiligt (Maloy und Powrie 2001, Wood und Sakaguchi 2003).

Die Wirkung der Treg-Zellen wird normalerweise zum einen über einen direkten Zell-Zellkontakt und zum anderen durch die Produktion löslicher Mediatoren vermittelt (Maloy und Powrie 2001, Kingsley *et al.* 2002), wobei die genauen zugrunde liegenden Mechanismen immer noch nicht geklärt sind.



In dem murinen Abortmodell konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Treg-Zellen in den Abortmäusen im Vergleich zu normal-trächtigen Mäusen signifikant reduziert ist (Zenclussen *et al.* 2005). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass der Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen aus schwangeren CBA/J, die mit BALB/c Männchen verpaart wurden, in der Lage war, die Abortrate signifikant zu reduzieren. Zenclussen und Mitarbeiter (2006) zeigten weiterhin, dass es bei einem Transfer von Treg-Zellen in schwangeren Abortmäusen zu einem Anstieg an HO-1 und TGF- $\beta$  in diesen Tieren kam. Die Autoren postulierten daher, dass die Treg-Zellen an der feto-maternalen Grenze eine Art tolerantes Mikromilieu schaffen, was sich positiv auf den Schwangerschaftsverlauf auswirkt. Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe (Zenclussen *et al.* 2006) konnte nachweisen, dass die Treg-Zellen bereits sehr früh nach der Befruchtung im Bereich der Vagina generiert werden und dass die Treg-Zellen zu ihrer Aktivierung männliche Antigene benötigen.

Die Analyse der Lymphozyten aus der Milz und der Dezidua ergab im Rahmen dieser Arbeit sowohl am Tag 8 als auch am Tag 14 der Schwangerschaft keinen Unterschied in der Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen in den Tieren, die mit Co-PP bzw. Zn-PP behandelt wurden, im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Dies würde bedeuten, dass die HO-1 Expression keinen Einfluss auf die Anzahl von Treg-Zellen hat, was jedoch im Widerspruch zu anderen Studien steht, die den Einfluss der HO-1 Expression auf Treg-Zellen untersucht haben.

So beobachteten Yamashita und Mitarbeiter (2006), dass es nach Herztransplantationen, bei denen die Expression von HO-1 erhöht wurde, zu einer erhöhten Expression des Treg-Marker Foxp3, aber auch von TGF- $\beta$  und CTLA4 kam, was darauf hindeutet, dass Treg-Zellen bei der verbesserten Akzeptanz des Transplantates eine Rolle spielen.

Choi *et al.* (2005) hingegen zeigte, dass Foxp3 (engl.: forkhead box P3) ein Marker für Treg-Zellen, dessen Expression mit der Aktivität der T-regulatorischen Zellen verbunden ist (Brunkow *et al.* 2001, Fontenot *et al.* 2003, Khattri *et al.* 2003), in der Lage sei, HO-1 zu induzieren, was bedeuten würde, dass die Treg-Zellen die HO-1 Expression induzieren, was im Gegensatz zu der Studie von Yamashita und Mitarbeiter (2006) steht.

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von PD Dr. Zenclussen konnten zeigen, dass es in der Plazenta von Abortmäusen, welche mit Co-PP behandelt wurden, zu einem signifikanten Anstieg der Neuropilin-1 mRNA kam, wenn man diese mit der mRNA in den Kontrollgruppen verglich. Abortmäuse, die mit Zn-PP behandelt wurden, zeigten keine Veränderungen der Neuropilin-1 mRNA Menge im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die erhöhten Mengen an Neuropilin-1 in der Plazenta von Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden, lassen vermuten, dass es in der Plazenta dieser Tiere zu einer vermehrten Ansammlung von Treg-Zellen kommt.

Es ist daher anzunehmen, dass die am Tag 8 und 14 der Schwangerschaft gemessene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation hauptsächlich aus aktivierten Zellen besteht und dass daher keine Unterschiede in der Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen zwischen den Co-PP und Zn-PP behandelten Gruppen und den Kontrollgruppen beobachtet werden konnten.

#### **6.4.3 Die iNOS und eNOS Expression am Tag 14 der Schwangerschaft weist keine Interaktion mit dem HO-System auf**

Ramsay und Mitarbeiter (1996) beschrieben, dass die Aktivität von NOS und somit die Menge an NO besonders im ersten Trimester der humanen Schwangerschaft eine Rolle spielt. Sladek und Mitarbeiter (1997) und Chwalisz und Garfield (2000) konnten zeigen, dass NO eine wichtige Funktion bei der Ovulation und Implantation übernimmt und somit eine vermehrte Aktivität von NOS zu diesem Zeitpunkt notwendig ist.

Maines (1997) beschrieb, dass es aufgrund des Häms, welches für die Synthese von NOS benötigt wird, einen Zusammenhang zwischen dem HO-System und dem NOS-System besteht. Die Daten der HO-1 und HO-2 Expression, die im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurden, lassen unter anderem vermuten, dass HO besonders zu Beginn der Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielt, da eine Hochregulation von HO-1 mittels Co-PP zu diesem Zeitpunkt zu verminderten Abortraten führt.

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Abortmäusen, in denen man eine verringerte Expression von HO-1 und HO-2 im Vergleich zu normal-schwangeren Mäusen beobachten konnte, ebenfalls eine verringerte Expression von iNOS und eNOS aufwiesen.

Purcell und Mitarbeiter (1999) konnten ebenfalls bei der Maus zu Beginn der Schwangerschaft die Expression von iNOS und eNOS beobachten.

Diese Fakten ließen vermuten, dass eine erhöhte Expression von HO-1 ebenfalls zu einer vermehrten Aktivität des NOS-Systems führen sollte.

Die Expression von iNOS und eNOS konnte in der humanen Plazenta in den Trophoblasten nachgewiesen werden (Myatt et al. 1997). Nelson und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass erhöhte Mengen an eNOS mit einer erfolgreichen Schwangerschaft in Verbindung gebracht werden können und führten dies auf eine erhöhte Expression in den humanen Arterien des Uterus zurück. Die immunhistochemische Analyse dieser Arbeit zeigte in den Riesenzellen der Plazenta und in der Dezidua eine erhöhte iNOS und eNOS Expression in den Tieren, die mittels einer Co-PP-Behandlung vor einem Abort geschützt waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Produktion von iNOS und

eNOS, induziert durch eine erhöhte Expression von HO-1, sich auf die Dezidua und die äußeren Bereiche der Plazenta konzentriert, um dort mittels der Freisetzung von NO die Blutgefäße zu erweitern, um so die Feten vor einem Abort zu schützen.

Die IHC-Daten konnten aber weder durch die Western-Blot Analyse, noch durch die Bestimmung der mRNA von iNOS und eNOS am Tag 8 und 14 der Schwangerschaft bestätigt werden. Beide Untersuchungsmethoden zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression bzw. der mRNA Menge zwischen den Tieren, die mit Co-PP bzw. Zn-PP behandelt wurden und den Kontrollgruppen.

Die unterschiedlichen Daten können dadurch erklärt werden, dass bei der IHC die erhöhte Expression von eNOS und iNOS in der Plazenta auf die Riesenzellen und die Dezidua beschränkt ist, beim Western-Blot und bei der RT-PCR aber die gesamte Plazenta untersucht wird.

Haddad und Mitarbeiter (1995) beschrieben ebenfalls eine spezifische iNOS Expression in Makrophagen der Dezidua und postulierten daher, dass diese Makrophagen der Dezidua für die NO Produktion am Ort der Implantation verantwortlich sind.

Die Daten würden somit darauf hindeuten, dass die Expression von iNOS und eNOS nicht durch eine veränderte Expression von HO-1 am Tag 14 der Schwangerschaft beeinflusst wird. Im Laufe der Schwangerschaft wurde NO besonders im Zeitraum der Preimplantation und Implantation eine wichtige Funktion zugeschrieben (Gaglioti *et al.* 2000, Nishikimi *et al.* 2001, Tranguch *et al.* 2003). Die Induktion der HO-1 Expression erfolgte am Tag 4 der Schwangerschaft, also während der Implantationsphase, so dass die Wechselwirkung zwischen dem NOS-System und HO-1 genau zu diesem Zeitpunkt erfolgt sein kann und daher am Tag 14 der Schwangerschaft keine Unterschiede mehr in der Expression erkennbar sind.

#### **6.4.4 Die erhöhte Expression von HO-1 führt am Tag 14 der Schwangerschaft zu einer verminderten Apoptose und zu einem Anstieg der Expression anti-apoptotischer Moleküle**

Die Apoptose spielt im Laufe der Schwangerschaft sowohl bei dem Aufbau bzw. der Neuordnung der Plazenta, aber auch bei der Entwicklung des Embryos, der sich im Laufe der Schwangerschaft ständig verändert, eine wichtige Rolle (Smith *et al.* 1997, Axt *et al.* 1999, Chan *et al.* 1999, Brill *et al.* 1999, Torry *et al.* 2003). HO-1 wurden sowohl anti-apoptotische

als auch gewebsschützende Funktionen nachgesagt. Daher könnte die Apoptose ein weiterer Mechanismus sein, mit dessen Hilfe das HO-System den Feten vor einem Abort schützt

So zeigten Soares und Mitarbeiter (1998), dass eine erhöhte Expression an HO-1 Endothelzellen vor einer TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose schützt. Aber auch HO-2 scheint anti-apoptotische Eigenschaften aufzuweisen, denn Basuroy und Mitarbeiter. (2006) zeigten erst kürzlich, dass HO-2 das kardiovaskuläre Endothelium vor einer TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose bzw. einer Apoptose, die durch oxidativen Stress induziert wurde, schützt. Es ist aber bisher nicht genau geklärt, wie HO das Gewebe vor Apoptose schützt. Jedoch scheint CO, was beim Abbau von Häm freigesetzt wird, hierbei eine wichtige Rolle übernimmt. So beschrieben Liu und Mitarbeiter (2002), dass CO die Freisetzung von Cytochrom c hemmt, wodurch die Aktivierung der Caspasenkaskade und NF $\kappa$ -B blockiert wird, was die Zellen vor Apoptose schützt (Brouard *et al.* 2000/2002).

Die verminderten Abortraten, die man in den Tieren, die mit Co-PP behandelt wurden, beobachten konnte, könnten somit unter anderem durch eine verminderte Apoptosesrate zu erklären sein, die möglicherweise durch die erhöhte Expression von HO-1 ausgelöst wurde.

Um den möglichen Einfluss einer erhöhten HO-1 Expression, die durch eine Co-PP Applikation induziert wurde, auf die Apoptose zu untersuchen, wurde zum einen die Caspase-3-Aktivität bestimmt und zum anderen die Anzahl an apoptotischen Zellen ermittelt.

Die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität erfolgte durch einen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Es konnte ein leichter Rückgang der Caspase-3-Aktivität in den Tieren, die eine erhöhte HO-1 Expression zeigten, festgestellt werden. Sass und Mitarbeiter (2003) hingegen zeigten, dass die Hemmung der Caspase-3-Aktivität durch eine erhöhte Expression von HO-1 zu verminderten Leberschäden, welche durch Apoptose induziert wurden, führte.

Die Analyse der TUNEL-Färbung zeigte einen leichten, aber nicht signifikanten Rückgang in der Anzahl an apoptotischen Zellen in der Plazenta der Tiere, die durch eine erhöhte Expression von HO-1 vor einem Abort geschützt wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Behandlung mit Zn-PP hatte keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass der HO-1 vermittelte Schutz durch eine verminderte Apoptosesrate in diesen Tieren erklärt werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wurden von M. Zenclussen und Mitarbeiter (2006) erhoben. Die Autoren konnten zeigen, dass die Anzahl an apoptotischen Zellen in Abortmäusen, die nach einer Behandlung mit AdHO-1/GFP eine verminderte Abortrate aufwiesen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant reduziert war.

Der Rückgang der apoptotischen Zellen war in dieser Arbeit im Gegensatz zu der Studie von M. Zenclussen und Mitarbeiter (2006) nicht signifikant, was auf die unterschiedliche Art der Behandlung zurückzuführen sein dürfte, da die Applikation von Co-PP, anders als bei der Genterapie mit HO-1, noch andere Signalwege aktivieren kann, die einen Einfluss auf die Apoptose nehmen könnten

Die Vorgänge im Verlauf der Apoptose werden unter anderem durch Mitglieder der Bcl2-Molekülfamilie moduliert, die man aufgrund ihrer Wirkung in pro- und anti-apoptische Proteine unterteilt. Zu den pro-apoptischen Molekülen gehören u.a. Bax, Bak, Bid, Bad. Zu den anti-apoptischen Molekülen gehören u.a. Bcl-2, Bcl-xl, Bag-1. Ihre Funktion liegt in der Hemmung der Freisetzung von pro-apoptischen Molekülen wie Cytochrom-c und in der Blockade der Aktivierung der Pro-Caspase 9.

Bag-1 wurde zuerst als ein Interaktionspartner des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 beschrieben und zählt heute zu der Bcl-2 Proteinfamilie (Takayama *et al.* 1995). Es wurde nachgewiesen, dass Bag-1 mit einer Vielzahl von Molekülen, wie Hitzeschockproteinen, Hormonrezeptoren, Signalmolekülen sowie auch mit Bcl-2, interagiert (Townsend *et al.* 2005). Schulz und Mitarbeiter (1997) zeigten, dass Bag-1 in der Lage war, die Caspase-Aktivität zu blockieren und dass diese Blockierung durch die Expression von Bcl-2 noch verstärkt wurde.

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es nach der Behandlung von Abortmäusen mit Co-PP im Vergleich zu den Kontrollgruppen in der Plazenta zu einem Anstieg der Bag-1 mRNA kommt.

Ähnliche Beobachtungen konnten nach einer HO-1 Induktion mittels Genterapie in Abortmäusen gemacht werden, die zu einem signifikanten Anstieg der Bag-1 mRNA Menge führte (Zenclussen *et al.* 2006). Bei Lebertransplantaten konnten Coito und Mitarbeiter (2002) zeigen, dass eine erhöhte Expression von HO-1, induziert mittels Genterapie, zu einer erhöhten Expression von Bag-1 führt.

Diese Daten lassen vermuten, dass eine erhöhte HO-1 Expression einen direkten Einfluss auf die Bag-1 Expression hat und dass die erhöhte Bag-1 Expression durch eine Reduktion der apoptotischen Zellen den Feten vor einem Abort schützt.

## 6.5 Zusammenfassung der HO-1 Daten beim Spontanabort

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass das Häme-degradierende Enzym HO bei der spontanen Fehlgeburt eine wichtige Rolle übernimmt. Es wurde gezeigt, dass in

Abortmäusen im Vergleich zu normal-trächtigen Mäusen, die HO-1 Expression signifikant reduziert ist. Die Hochregulation von HO-1 mittels einer Co-PP Applikation konnte den Feten vor einer immunologischen Abstoßung schützen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Zn-PP, ein HO-1 und HO-2 Hemmer die Abortrate hochreguliert, was erstmalig zeigt, dass eine verminderte HO-1 und HO-2 Expression nicht mit einer erfolgreichen Schwangerschaft vereinbar ist.

Entgegen unseren Erwartungen wurde der HO-1 induzierte Schutz vor einem Abort nicht durch eine veränderte Th1/Th2 Antwort hervorgerufen. Eine Interaktion zwischen dem des HO-Systems und dem NOS-Systems konnte nicht nachgewiesen werden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es in Mäusen, die durch eine erhöhte Expression von HO-1 vor einem Abort geschützt sind, es zu einer verminderten Anzahl an apoptotischen Zellen kommt, wobei die Verminderung der apoptotischen Zellen auf eine erhöhte Expression von Bag-1, welches als Zytoprotektives Molekül fungiert, zurückzuführen ist.

## **6.6 Das HO-System in einem Mausmodell für Präeklampsie**

### **6.6.1 Der Transfer von aktivierten Th1-Zellen führte zu Präeklampsie-ähnlichen Symptomen**

Die Präeklampsie ist eine späte Schwangerschaftskomplikation, die bei etwa 10% aller Schwangerschaften auftritt (Robillard 2002, Klockenbusch 2005). Die Pathologie der Präeklampsie ist definiert als eine Gestationshypertonie in Verbindung mit einer Proteinurie im 24-Stunden Urin ( $\geq 0,3\text{g}$  Eiweiß). Um die mögliche Rolle von HO in der Präeklampsie zu untersuchen, wurde auf ein Mausmodell für Präeklampsie zurückgegriffen, welches von Zencussen und Mitarbeiter (2004) zuerst beschrieben wurde.

In diesem Modell verursacht der Transfer von aktivierten Th1 Zellen in C57BL/6-verpaarte schwangere BALB/c Mäuse Präeklampsie-ähnliche Symptome, wie erhöhte Blutdruckwerte, Proteinurie und auch Schädigungen der Niere. Die Autoren zeigten, dass nicht-schwangere Mäuse, die mit aktivierten Th1-Zellen behandelt wurden, keine Präeklampsie-ähnlichen Symptome entwickelten, was darauf hindeutet, dass die Behandlung schwangerschaftsspezifisch ist und sich nur auf trächtige Mäuse auswirkt. Bei der Durchführung des Tierversuches konnte man im Rahmen dieser Doktorarbeit eine signifikante Erhöhung des Blutdruckes in den Tieren beobachten, die am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft mit aktivierten Th1-Zellen behandelt wurden.

Zenclussen und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass der Transfer von Th1 Zellen einen maximalen Blutdruck von 217 mmHg auslöst. Der maximale Blutdruck im Rahmen dieser Arbeit lag jedoch nur bei 149 mmHg. Der Blutdruck bei den normal-schwangeren Mäusen war hingegen vergleichbar mit den bereits publizierten Daten und lag während der gesamten Schwangerschaft um 120 mmHg.

Die unterschiedlich maximalen Blutdruckwerte zwischen den beiden Versuchen könnten auf veränderte Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Beide Versuche wurden in der gleichen Tierhaltung durchgeführt, aber zwischen den beiden Versuchen wechselte in der Tierhaltung das Futter von pelletiertem Futter zu extrudiertem Futter und die Streu der Käfige von der 8-15 Streu zur FS-14 Streu (Firma Sniff). Zu Beginn des Versuches wurde das Blutdruckmessgerät erneut kalibriert, sodass auch dies eine mögliche Quelle für die unterschiedlich maximalen Blutdruckwerte sein könnte.

Histologische Untersuchungen der Niere und der Plazenta zeigten massive Einblutungen in beiden Geweben. In der Niere kam es darüber hinaus zur histologischen Deorganisation in den Glomerulie und zur Lymphozyteninfiltration. Die histologischen Veränderungen der Gewebe und die erhöhten Blutdruckwerte zeigten, dass der Transfer der aktivierten Th1-Zellen bei den Mäusen Präeklampsie-ähnliche Symptome auslöste. Die hohen Abortraten, die man sowohl in den normal-schwangeren Mäusen als auch in den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen beobachten kann, weisen keinen immunologischen Hintergrund auf, da die beobachteten Abortereignisse bereits zwischen dem 7. und 8. Tag der Schwangerschaft auftraten, also bereits vor der Th1-Zellinjektion. Die beobachteten Aborte sollten vielmehr die Folge von Stress sein, der Aufgrund der Blutdruckmessung ausgelöst wurde, da diese jeden zweiten Tag erfolgte.

#### **6.6.2 Die Hämoxygenase scheint bei den Präeklampsie-ähnlichen Symptomen im Mausmodell keine Rolle zu spielen.**

Beim Abbau des Häms durch HO-1 entsteht CO, was eine Erweiterung der Blutgefäße induziert, und Biliverdin, welches als ein endogenes Antioxidanz wirkt und die Gefäße und Fettsäuren vor Oxidation schützt (Maines 1997). Aufgrund dieser Abbauprodukte des Häm-Metabolismus kann man eine Rolle von HO-1 während der Präeklampsie postulieren.

Die Rolle von HO-1 und HO-2 ist jedoch bei der Präeklampsie im Gegensatz zum spontanen Abort relativ umstritten.

Ahmed und Mitarbeiter (2000) beschrieben signifikant reduzierte Mengen an HO-1 in der Plazenta von Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen im gleichen Schwangerschaftsmonat.

Im Synzytiotrophoblasten sowie in invasiven Trophoblasten Zellen konnte eine stark verminderte Expression von HO-2 bei Patientinnen mit Präeklampsie beobachtet werden im Vergleich zu schwangeren Frauen mit einer fetalen Wachstumshemmung, die sich im gleichen Schwangerschaftsmonat befanden (Zenclussen *et al.* 2003). Die Autoren beschrieben zudem einen Rückgang der HO-1 Expression, jedoch war dieser nicht signifikant.

Lash und Mitarbeiter (2003) beschrieben, dass es in den beschädigten Regionen der Plazenta von Patientinnen mit Präeklampsie zu einer verminderten Proteinexpression von HO-1 und HO-2 kommt im Vergleich zu den Regionen der gleichen Plazenta, die nicht beschädigt waren. Keine bzw. eine sehr geringe Expression von HO-1 in der Plazenta von Frauen mit Präeklampsie beobachten Barber und Mitarbeiter (2001). HO-2 konnte hingegen in Endothelzellen und Synzytiotrophoblasten Zellen nachgewiesen werden. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die Expression von HO-2 in den Endothelzellen nicht jedoch in Synzytiotrophoblasten Zellen, von Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu normal-schwangeren Frauen stark reduziert war.

McLaughlin und Mitarbeiter (2003) hingegen konnten eine erhöhte Expression von HO-1 in den Chorionzotten und der fetalen Membran in Präeklampsieschwangerschaften im Vergleich zu normalen Schwangerschaften beobachten.

Die bisherigen Daten über die Funktion von HO-1 beschränken sich auf Studien beim Menschen und zeigen kontroverse Ergebnisse. In dieser Arbeit sollte daher erstmalig die Expression von HO-1 in dem Mausmodell für Präeklampsie untersucht werden.

Die Immunhistochemische Analyse der Plazenta und der Dezidua ergab in allen Zelltypen keine Unterschiede in der HO-Expression zwischen den normal-schwangeren Mäusen und den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen.

Eine Untersuchung der HO-1 mRNA konnte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen und den normal-schwangeren Mäusen aufweisen. Man könnte daher postulieren, dass das Mausmodell für Präeklampsie unzureichend ist, um immunologische Vorgänge bei einer Präeklampsie zu untersuchen. Im Rahmen des Tierversuches konnte von Mitgliedern der Arbeitsgruppe jedoch belegt werden, dass die eNOS Proteinexpression von der Menge an eNOS mRNA in den Tieren, die mit aktivierten Th1-Zellen behandelt worden waren, signifikant erhöht war im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die erhöhte Expression von eNOS in dem Mausmodell für Präeklampsie wäre



demnach ein Kompensationmechanismus für den erhöhten Blutdruck, der als Folge einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems auftritt (Schmid *et al.* 2006).

Diese Daten lassen somit vermuten, dass das HO-System in dem Mausmodell für Präeklampsie eine untergeordnete Rolle spielt.

Um zu untersuchen, ob die HO-1 Hoch- bzw. Herunterregulation einen Einfluss auf die Präeklampsie-ähnlichen Symptome hat, wurden die Tiere an den Tagen 10 und 12 der Schwangerschaft mit aktivierten Th1-Zellen behandelt und zusätzlich am Tag 10 der Schwangerschaft mit Co-PP bzw. Zn-PP behandelt um HO-1 hoch- bzw. herunterzuregulieren.

Die Analyse der Blutdruckkurve zeigte, dass keine von den Behandlungen den Verlauf des Blutdrucks beeinflussen konnte. Die unterschiedlich hohen Blutdruckwerte der beiden Behandlungen am Tag 14 der Schwangerschaft waren nicht statistisch signifikant.

Diese Daten deuten darauf hin, dass bei dem Mausmodell für Präeklampsie die veränderte HO-1 Expression keinen Einfluss auf die Symptome hat und somit ist es unwahrscheinlich, dass HO-1 in dem Mausmodell für Präeklampsie eine Rolle spielt.

### **6.6.3 In Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen kommt es in der Dezidua zu einer erhöhten Produktion von Th1-Zytokinen**

Das Krankheitsbild der Präeklampsie ist unter anderem durch eine stark erhöhte inflammatorische Immunantwort charakterisiert. Saito und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes von Frauen mit Präeklampsie mehr TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IL-2 produziert wird, als in mononuklearen Zellen normal-schwangerer Frauen. Zusätzlich konnte von Darmochwal-Kolarz und Mitarbeiter (1999) gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 in mononuklearen Zellen von Präeklampsie-Patientinnen signifikant reduziert ist.

Das Mausmodell für Präeklampsie beruht auf dem Transfer von aktivierten Th1-Zellen, daher war es auch nicht verwunderlich, dass es in den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen im Vergleich zu normal-schwangeren Mäusen in der Dezidua zu einem signifikanten Anstieg an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  kommt. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 waren in den Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen nur leicht reduziert.

Zenclussen und Mitarbeiter (2004) postulierten bei der Etablierung des Mausmodells für Präeklampsie, dass die Injektion von aktivierten Th1-Zellen zu einer erhöhten Produktion von Th1-Zytokinen in der trächtigen Maus führt. Durch die erhöhte Th1-Zytokinproduktion

kommt es zur Stimulierung des Immunsystems der Maus und die mauseigenen Th0-Zellen entwickeln sich zu Th1-Zellen.

Die erhöhte Th1-Zytokinproduktion, die in dieser Arbeit in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen an der feto-maternalen Grenze beobachtet wurde, steht im Gegensatz zu der Studie von Arriaga-Pizano und Mitarbeiter (2005). Die Autoren zeigten, dass ausschließlich im peripheren Blut von Frauen mit Präeklampsie, aber nicht im choriodezidualen Blut und im Nabelschnurblut eine Th1-Zytokindominanz vorliegt.

Dass es in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptomen an der feto-maternalen Grenze zu einer erhöhten Th1-Dominanz kommt, könnte auf die künstliche Induktion der Präeklampsie-ähnlichen Symptome zurückzuführen sein. Allerdings konnten Zenclussen und Mitarbeiter (2004) durch die Markierung der transferierte Th1-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) nachweisen, dass an der feto-maternalen Grenze die meisten CCR5-positiven Zellen, wobei CCR5 einen Marker für Th1-Zellen darstellt, wirtseigene Zellen waren und nicht transferierte Th1-Zellen. Daher ist zu vermuten, dass die hohen Mengen an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch mauseigene Zellen produziert wurden und nicht durch die transferierten Zellen.

## **6.7 Zusammenfassung der HO-1 Daten beim murinen Modell für Präeklampsie**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es in Mäusen mit Präeklampsie-ähnlichen Symptome zu keiner veränderten HO-1 Expression kommt. Sowohl die Induktion als auch die Hemmung der HO-1 haben keinen Einfluss auf die Präeklampsie-ähnlichen Symptome, sodass man postulieren kann, dass die HO-1 Expression bei der Ausbildung Präeklampsie-ähnlicher Symptome keine Rolle spielt.

In Rahmen des Tierversuches konnte zudem gezeigt werden, dass man mit dem Mausmodell für Präeklampsie, das von Zenclussen und Mitarbeiter (2004) erstmalig beschrieben wurde, in der Lage ist die molekularen Vorgänge, die während einer Präeklampsie auftreten, zu analysieren, da sowohl die Daten der HO-1 Expression sowie auch der eNOS Expression (Schmid *et al.* 2006) in diesem Mausmodell mit den Humandaten vergleichbar sind.

## 7. Zusammenfassung

Die Schwangerschaft ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zu einer Interaktion zwischen dem mütterlichen Immunsystem und dem Fetus kommt. Der allogene Fetus kann als natürlich auftretendes Allotransplantat angesehen werden. Man nimmt daher an, dass die Toleranzmechanismen, die im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft auftreten, den Mechanismen zur Akzeptanz eines Transplantates ähnlich sind.

HO-1 wurde als ein gewebe-schützendes und anti-apoptotisches Molekül beschrieben, welches eine wichtige Rolle bei der Akzeptanz von Transplantaten spielt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass HO-1 in der Plazenta verschiedener Spezies exprimiert wird und dass die Expression von HO-1 bei Schwangerschaftskomplikationen, wie dem spontanen Abort, vermindert ist. Dies lässt vermuten, dass HO im Laufe der Schwangerschaft eine Rolle spielt. In diesem Kontext sollte die vorliegende Arbeit das Verständnis über die Funktion von HO-1 bei den beiden Schwangerschaftskomplikationen spontaner Abort und Präeklampsie (Schwangerschaftshypertonie) erweitern.

Mit Hilfe des Mausmodells für einen spontanen Abort, bei dem weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen DAB/2J Mäusen verpaart werden, wurde der Einfluss der HO-1 Expression auf die Abortrate untersucht und mit BALB/c-verpaarten CBA/J Weibchen, welche eine normale Schwangerschaft aufweisen, verglichen. In Mäusen mit spontanem Abort zeigte sich eine Reduktion der HO-1 und HO-2 Expression. Die Induktion von HO-1 mittels Co-PP war in der Lage, die Abortrate zu senken, wohingegen eine Reduktion der HO-1 mittels Zn-PP die Abortrate erhöhte. Es zeigte sich, dass es neben der Induktion von HO-1 auch zu einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bag-1 kam.

Im Mausmodell für Präeklampsie wurde ebenfalls die Expression von HO-1 und möglicher Interaktionspartner untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer erhöhten bzw. verminderten HO-1 Expression auf die Präeklampsie-ähnlichen Symptome in diesem Mausmodell analysiert. Im Laufe der Arbeit zeigte sich jedoch, dass HO-1 Veränderungen keinen Einfluss auf die Präeklampsie-ähnlichen Symptome hat.

Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass eine erhöhte Expression von HO-1 zum Zeitpunkt der Implantation den Fetus vor einem spontanen Abort schützt und dass die protektive Funktion von HO-1 durch eine Interaktion mit anti-apoptotischen Molekülen wird. Bei der Präeklampsie hingegen scheint HO-1 keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

## 7.1 Abstract

Pregnancy maintenance is a very complex phenomenon, involving interactions between the maternal immune system and the semiallogenic foetus, which does not lead to immune rejection but to tolerance. Thus it is thought that the tolerance mechanisms involved in a successful pregnancy are closely related to those allowing graft acceptances.

Heme Oxygenases (HO) were described to be tissue-protective and to have anti-apoptotic properties. Up-regulation of HO, particularly of HO-1, allows tissue tolerance after transplantation. The presence of HO-1 had been reported in the placenta of different species during normally progressing pregnancies; in pregnancy complications like spontaneous abortion the levels of HO-1 were reduced. This led to the proposal that HO-1 may play a protective role. The aim of this work was to analyze the influence of HO-1 changes in the outcome of pregnancy, using two different murine models for pregnancy complications, namely of spontaneous abortion and pre-eclampsia.

The influence of HO-1 expression on the abortion rate was analysed in DBA/2J-mated CBA/J females, which spontaneously show high abortion rates compared to BALB/c-mated CBA/J females, having fully normal pregnancy. The induction of HO-1 by Co-PP led to diminished abortion rates, while the blocking of HO-1 and HO-2 by Zn-PP boosted abortion. In mice with reduced abortion rates after HO-1 induction, up-regulated levels of the anti-apoptotic molecule Bag-1 could be observed.

In mice showing signs for preeclampsia after transfer of Th1 activated cells, the expression of HO-1, Th1/Th2 and eNOS was analysed. Furthermore HO-1 was up- or down-regulated by using Co-PP or Zn-PP respectively. HO-1 changes did not influence the outcome of the disease, as we could not observe a diminution in the blood pressure levels.

In summary, the results of this study indicate that high levels of HO-1 during implantation are able to prevent foetal rejection and that the beneficial effects of the HO-1 induction are related to the up-regulation of tissue protective molecules as Bag-1. No relationship could be observed between HO-1 levels and preeclampsia outcome.

## 8. Literaturverzeichnis

Acevedo CH, Ahmed A (1998): Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is up regulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* 101: 949-955

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002): Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 15;250(2):358-73

Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B, St John J (2000): Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNF-alpha. *Mol Med* 6: 391-409.

Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Walter (2005): Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. 3. Auflage Wiley-VCH Weinheim

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 1;357(Pt 3):593-615. Review

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5:266-71

Applegate LA, Luscher AP, Tyrrel RM (1991): Induction of hemeoxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 51: 974-978

Arriaga-Pizano L, Jimenez-Zamudio L, Vadillo-Ortega F, Martinez-Flores A, Herrerias-Canedo T, Hernandez-Guerrero C (2005): The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. *J Soc Gynecol Investig* 12(5):335-42

Axt R, Meyberg R, Mink D, Wasemann C, Reitnauer K, Schmidt W. (1999): Immunohistochemical detection of apoptosis in the human term and post-term placenta. *Clin Exp Obstet Gynecol* 26:56-59

- Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL (2004): Indolamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* 61(2):67-77
- Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL (2000): HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 48(1):17-26
- Balla G, Vercellotti GM, Müller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS (1991): Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 64: 648-655
- Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM (1991): Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* 11(6):1700-11
- Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM (1993): Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9285-9289
- Balla J, Belcher JD, Balla G, Jacob HS, Vercellotti GM (1993): Oxidized low-density lipoproteins and endothelium: oral vitamin E supplementation prevents oxidized low-density lipoprotein-mediated vascular injury. *Trans Assoc Am Physicians* 106:128-33
- Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM (2000): Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood* 1;95(11):3442-50
- Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G (2003): Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 5:v8-12. Review
- Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer J, Lyall F (2001): Heme Oxygenase expression in human placenta and placental bed: reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction. *FASEB J* 15: 1158-1168

Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, Leffler CW, Parfenova H (2006): Heme Oxygenase-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF{alpha} in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (Epub ahead of print)

Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS (2002): Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Hum Reprod* 17(9):2439-44

Becker V, Schiebler ThH, Kubli F (1981): Die Plazenta des Menschen. *Thieme Verlag*, Stuttgart; New York

Beinder E, Mohaupt MG, Schlembach D, Fischer T, Sterzel RB, Lang N, Baylis C. (1999): Nitric oxide synthase activity and Doppler parameters in the fetoplacental and uteroplacental circulation in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 18(2):115-27

Benirschke K, Kaufmann P (2001): Pathology of Human Placenta, 4<sup>th</sup>, *Springer Verlag*, New York

Berdeaux A (1993): Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam Clin Pharmacol* 7(8):401-11 Review

Bianchi D, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW (1994): Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 171(4):922-6

Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B (2004): Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase-8. *Cell Death Differ* 11:90-8.

Boue J, Bou A, Lazar P (1975): Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12(1):11-26

Brill A, Torchinsky A, Carp H (1999): The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 16:512-9

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP (2000): Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192:1015-1026

Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP (2002): Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277(20): 17950-61

Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W (2004): Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34 (3): 623-360

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yassayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001): Disruption of a new forkhead / winged helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genet* 27(1):68-73

Casado M, D-iaz-Guerra MJ, Rodrigo J, Fernandez AP, Bosca L, Martin-Sanz P (1997): Expression of the calcium-independent cytokine-inducible (iNOS) isoform of nitric oxide synthase in rat placenta. *Biochem J* 15;324 ( Pt 1):201-7

Chan CCW, Lao TT, Cheung ANY (1999): Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. *Placenta* 20:223–227

Chaouat G, Kolb JP, Wegmann TG (1983): The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus. *Immunol Rev* 75:31-60

Chaouat G, Clark DA, Wegmann TG (1988): Genetic aspects of the CBA x DBA/2 and B10 x B10. A models of murine pregnancies failure and its prevention by lymphocytes immunisation. Beard R, Sharp F (eds): Early pregnancy loss: mechanisms and treatment. *RCOG Press London* 89-102



Chaouat G, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG (1995): IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 154:4261-8

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J (2002): A brief review of recent data on some cytokine expressions at the maternal-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 53:241-56

Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J (2004): Th1/Th2 paradigm in pregnancy: Paradigm lost? *Int Arch Allergy Immunol* 134:93-119

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL (1994): Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265(5176):1237-40

Chwalisz K, Garfield RE (2000): Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 15 Suppl 3:96-111 Review

Clark DA, McDermott MR, Szewczuk MR (1980): Impairment of host-versus graft reaction in pregnant mice: II) Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell Immuno*. 52(1):106-18

Clark DA, Arck PC, Chaouat G (1999): Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 41(1):5-22

Clark DA, Chaouat G, Gorczynski RM (2002): Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the maternal-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* 47(5):275-82

- Coito AJ, Buelow R, Shen XD, Amersi F, Moore C, Volk HD, Busuttil RW and Kupiec-Weglinski JW (2002): Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 74 (1): 96-102
- Coulam CB (1991): Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 26(1):23-7
- Croy BA, Guilbert LJ, Browne MA, Gough NM, Stinchcomb DT, Reed N, Wegmann TG (1991): Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J Reprod Immunol* 19(2):149-66
- Cuturi MC, Christoph F, Woo J, Iyer S, Brouard S, Heslan JM, Pignon P, Soullillou JP, Buelow R (1999): RDP1258, a new rationally designed immunosuppressive peptide, prolongs allograft survival in rats: analysis of its mechanism of action. *Mol Med* 5(12):820-32
- Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzelak B, Rolinski I, Oleszczuk J (1999): T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol Reprod Biol* 86: 165–170
- Datta PK, Gross EJ, Lianos EA (2002): Interactions between inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in glomerulonephritis. *Kidney Int* 61 (3): 847-850
- DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R, Bromberg JS (2000): Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation* 15;69(1):120-8
- Denschlag D, Marculescu R, Unfried G, Hefler LA, Exner M, Hashemi A, Riener EK, Keck C, Tempfer CB, Wagner O (2004): The size of a microsatellite polymorphism of the haem oxygenase 1 gene is associated with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 10(3):211-4
- Dong Z, Lavrovsky Y, Venkatachalam MA, Roy AK (2000): Heme oxygenase-1 in tissue pathology: the Yin and Yang. *Am J Pathol* 156(5):1485-8

- Dünker N, Kriegelstein K (2002): TGF- $\beta$ 2-/- and 3-/- double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol* 206:73-83
- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ (1982): Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 38(4):447-53
- Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO (2003): Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 188(5):1241-3
- Enders AC (1965): A comparative study of the fine structure in several hemochorial placenta, *Am J Anat* 116:29-68
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P (2003): Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206-12
- Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie AN (2002): IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* 17(1):7-17
- Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, Riviello C, Parretti E, Mello G, Abbate R (2006): Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal-fetal flow. *Am J Obstet Gynecol* 183(4):900-3
- Faxén, M., Nissel, H., Kublickiene, K.-R. (2001): Altered mRNA expression of eNOS and iNOS in myometrium and placenta from women with preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet* 256: 45-50
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH (1999): Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1(3):152-7

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4):330-6

Gaglioti, S., C. Scalone, E. Bevilacqua. (2000): Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biology of Reproduction* 62:260–268

Goerke K (2002): Taschenatlas der Geburtshilfe *Thieme Verlag* Stuttgart; New York

Gorivodsky M, Zemlyak I, Orenstein H, Savion S, Fein A, Torchinsky A, Toder V (1998): TNF-alpha messenger RNA and protein expression in the uteroplacental unit of mice with pregnancy loss. *J Immunol* 160(9):4280-8

Gorivodsky M, Torchinsky A, Zemliak I, Savion S, Fein A, Toder V (1999): TGF beta 2 mRNA expression and pregnancy failure in mice. *Am J Reprod Immunol* 42:124-133

Green, M. C. & Witham, B. A. (1991): Handbook on Genetically Standardized JAX Mice. Fourth edition, *The Jackson Laboratory*, Bar Harbor

Greer IA, Haddad NG, Dawes J, Johnstone FD, Calder AA (1989): Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol* 96: 978–982

Griffith OW, Stuehr DJ. (1995): Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-36 Review

Grimm S (2003): Die Apoptose: Programmierter Zelltod. *Chemie in unserer Zeit* 37(3):172 – 178

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13(15):1899 -911

Haddad EK, Duclos AJ, Baines MG (1995): Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J Exp Med.*1;182(4):1143-51

- Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ (1991): The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol Reprod* 44(1):69-75
- Hancock W, Buelow R, Sayegh M, Turka Lm (1998): Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 4:1392-1396
- Hengartner, M.O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776
- Ho HN, Chen SU, Yang YS, Huang SC, Lee TY, Gill TJ 3rd (1994): Age, environment, and lymphocyte immunization influence the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model. *Am J Reprod Immunol* 31(1):47-51
- Holländer GA (2006): Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis. *Urban & Fischer Deutschland*
- Hunt JS, Atherton RA, Pace JL (1990): Differential responses of rat trophoblast cells and embryonic fibroblasts to cytokines that regulate proliferation and class I MHC antigen expression. *J Immunol* 1;145(1):184-9
- Huppertz B, Hunt JS (2000): Trophoblast apoptosis and placental development-a workshop report. *Placenta* 21 (suppl A, Trophoblast Research) :74–76
- Ihara N, Akagi R, Ejiri K, Kudo T, Furuyama K, Fujita H (1998): Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS Letters* 439: 163-167
- Janeway C (2002): Immunologie. 5. Auflage *Spektrum Akad. Verl.* Berlin
- Joachim RA, Zenclussen AC, Fest S, Douglas A, Szekeres-Bartho J, Arck PC (2002): The progesterone Derivative Dydrogesterone Abrogates Murine Stress Triggered Abortion by Inducing a Th2 Biased Local Immune Response. *Am J Reprod Immunol* 47 (6): 358 abstract

Jones CA, Holloway JA, Warner JO (2002): Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy. *J Reprod Immunol* 56(1-2):45-60

Karteris, E., Vatish, M., Hillhouse, E.W., Grammatopoulos, D.K. (2005): Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cGMP pathway by CRH and CRH-related peptides. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 10: 2004 – 2210

Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2001): Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 1(2):121-8

Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2002): Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 27;73(2):287-92

Ke B, Ritter T, Kato H, Zhai Y, Li J, Lehmann M, Busuttil RW, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW (2000): Regulatory cells potentiate the efficacy of IL-4 gene transfer by up-regulating Th2-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway in transplant recipients. *J Immunol* 1;164(11):5739-45

Ke B, Shen XD, Melinek J, Gao F, Ritter T, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. (2001): Heme oxygenase-1 gene therapy: a novel immunomodulatory approach in liver allograft recipients? *Transplant Proc* 33(1-2):581-2

Keyse SM and Tyrell RM (1989): Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103

Khalil RA, Granger JP (2002): Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: Lessons from animal models. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 283:R29-45

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003): An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells *Nat Immunol* 4(4):337-42

- Kikuchi G, Yoshida T (1983): Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem* 53-54(1-2):163-83 Review
- Kingsley CL, Karim M, Bushell AR, Wood K (2002): CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080-86
- Kim CJ, Choe YJ, Yoon BH, Kim CW, Chi JG (1995): Patterns of bcl-2 Expression in Placenta. *Path Res Pract* 191: 1239-1244
- Kim SJ, Romeo D, Yoo YD, Park K (1994): Transforming growth factor-beta: expression in normal and pathological conditions. *Horm Res* 42(1-2):5-8
- Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS (2006): Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 27(4-5):438-44
- Klockenbusch, W (2005): Präeklampsie. 1. Auflage *UNI-MED*, Bremen
- Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ (1991): Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 39(1):31-6
- Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM (2004): No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens* 17(5 Pt 1):391-4
- Lash GE, McLaughlin BE, MacDonald-Goodfellow SK, Smith GN, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K, Graham CH (2003): Relationship between tissue damage and heme oxygenase expression in chorionic villi of term human placenta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1):H160-7
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG (1994): Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 21;91(13):5987-91

- Le Bouteiller P (1994): HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 14(2):89-129 Review
- Lee TS, Chau LY (2002): Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 8(3):240-6.
- Levy R, Nelson DM (2000): To be or not to be, that is the question: apoptosis in human trophoblast. *Placenta* 21:1–13
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG (1993): Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 151(9): 4562-73
- Lindquist S, Craig SA (1988): The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631 -677
- Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W (2002): Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1;55(2):396-405
- Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS (1996): Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1;88(11):4390-5
- Lucius R, Loos-Frank B (1997): Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner. Spektrum Akad Verl, Heidelberg, Berlin , Germany
- Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer J, Robson S (2000): Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J* 14: 208-219
- Lyouni S, Puy H, Tamion F, Scotte M, Daveau M, Nordmann Y, Lebreton JP, Deybach JC (1998): Nitric oxide synthase inhibition and the induction of cytochrome P-450 affect heme oxygenase-1 messenger RNA expression after partial hepatectomy and acute inflammation in rats. *Crit Care Med* 26(10):1683-9



Maines MD (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2(10):2557-68 Review

Maines MD (1992): The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(3):573-85 Review

Maines MD, Mayer RD, Ewig JF, Mc Coubrey WKJ (1993): Induction of kidney heme-oxygenase 1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 457-462

Maines MD (1997): The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:517-54 Review

Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP (2001): Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2(11):1018-24

Maloy KJ, Powrie F (2001): Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2:816-22

Mantovani A, Sozzani S, Introna M (1997): Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 832: 93-116

Marks GS (1991): Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40(7):863-70 Review

Martins PN, Kessler H, Jurisch A, Reutzel-Selke A, Kramer J, Pascher A, Pratschke J, Neuhaus P, Volk HD, Tullius SG (2005): Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity. *Transplant Proc* 37(1):384-6

McCoubrey WK Jr, Maines MD (1994): The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 25;139(2):155-61

- McCoubrey WK Jr, Eke B, Maines MD (1995): Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein. *Biol Reprod* 53(6):1330-8
- McCoubrey WKJ, Huang TJ, Maines MD (1997): Isolation and characterisation of cDNA from rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732
- McLaughlin BE, Lash GE, Smith GN, Marks GS, Nakatsu K, Graham CH, Brien JF (2003): Heme oxygenase expression in selected regions of term human placenta. *Exp Biol Med* (Maywood) 228(5):564-7
- McLean M, Bowman M, Clifton V, Smith R, Grossman AB (2000): Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 85(6):2345-9
- McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992): Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J Immunol* 148(6):1699-705
- McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BSS (1992): Cloned, expressed rat cerebellar NOS containing stoichiometric amounts of heme which binds CO. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11141-45
- Medawar, PB (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 44: 320-338
- Mellor AL, Munn DH (2001): Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. *J Reprod Immunol* 52(1-2):5-13
- Molnar M, Hertelendy F (1992): N-omega-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol* 166(5):1560-7
- Montellano PRO: The mechanism of heme oxygenase. *Curr Op Chem Biol* 2000. 4: 221-227.

Mosmann TR, Coffmann RL (1989): Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46:111-47

Moore KL, Persaud TVN (1996): Embryologie, Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. *Schattauer* Stuttgart; New York

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281(5380):1191-3

Müntener M, Hsu YC (1977): Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Acta Anat* 98:241-52

Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F (1997): Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 12 (1): 167-172

Napoletano, M., Miceli, F., Calce, A., Vacca, A., Gulino, A., Apa, R. & Lanzone, A. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85 (6): 2318-2323.

Nasiell J, Nisell H, Blanck A, Lunell NO, Faxen M (1998): Placental expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in pregnancy complicated by preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77 (5) : 492-496

Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. (2000): Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 1;87(5):406-11

Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, Ikeda S, Kira Y, Sato EF, Inoue M, Yamada M (2001): Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction* 122(6):957-63

Ober C (1998): HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet* 62(1):1-5 Review

Odrich MJ, Graham CH, Kimura KA, McLaughlin BE, Marks GS, Nakatsu K, Brien JF (1998): Heme Oxygenase and Nitric Oxide Synthase in The Placenta of the Guinea Pig During Gestation. *Placenta* 19: 509-516

Oian P, Omsjo I, Maltau JM, Osterud B (1985): Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. *Br J Obstet Gynaecol* 92:511–517

Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C, Capron F. (2003): Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 49(2):101-12

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6(4):422-8

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH (2003): Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24(8):449-55 Review

Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S (1998): Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4(9):1020-4

Pijnenborg R, Luyten C, Vercruysse L, Van Assche FA. (1996): Attachment and differentiation in vitro of trophoblast from normal and preeclamptic human placentas. *Am J Obstet Gynecol* 175: 30–36

Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L (2001): HO-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 50: 1983-1991

Piotrowski P, Croy BA (1996): Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biol Reprod* 54:1103-1110

Poss KD, Tonegawa S. (1997): Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(20):10925-30

Poss KD, Tonegawa S. (1997): Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94(20):10919-24

Potter M (1985): The BALB/c mouse. Current Topics in *Microbiol Immunol* 122. Springer-Verlag Berlin, New York, Tokyo

Pschyrembel (2004): Klinisches Wörterbuch, *Walter de Gruyter* Berlin - New York, 260. Auflage

Purcell TL, Buhimschi IA, Given R, Chwalisz K, Garfield RE (1997): Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal maternal interface and decreases prior to labour. *Mol Hum Reprod* 3: 485–491

Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE (1999): Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod* 5: 465-475

Raghupathy R (1997): Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18(10):478-82

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E (1999): Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 196(2):122-30

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R (2000): Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 15(3):713-8

Ramsay B, Sooranna SR, Johnson MR (1996): Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy. *Obstet Gynecol* 87(2):249-53

- Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF (2002): Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 35(5):1082-92
- Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL (1999): Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180: 499–506
- Reed JC (1994): Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6
- Reister F, Wagner P (2002): Genetische Disposition und Immunologie in: *Schwangerschaftshochdruck* Heilmann L, Rath W (Hrsh) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 39-47
- Robillard PY (2002): Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol* 53: 279-287
- Rodgers PA, Seidman DS, Wei PL, Dennery PA, Stevenson DK (1996): Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res* 39:1041–9
- Roman E (1984): Fetal loss rates and their relation to pregnancy order. *J Epidemiol Community Health* 38(1):29-35
- Roth DB (1963): The frequency of spontaneous abortion. *Int J Fertil* 8:431-4
- Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CW (1997): CD11b expression on circulating neutrophils in pre-eclampsia. *Clin Sci* 93: 187–189
- Sainte-Marie G (1962): A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J.Histochem Cytochem* 10:250-256
- Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H (1999): Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 5: 297–306

Saito S (2000): Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 47(2):87-103

Sanford TR, De M, Wood GW (1992): Expression of colony-stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD1 mice during days 1 to 3 of pregnancy. *J Reprod Fertil* 94(1):213-20

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S (2004): Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion. *Mol Hu Reprod* 10(5):347-53

Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP (2001): Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 15;166(6):4185-94

Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingorani AD (2001): Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy *Hypertension* 38(6):1289-93

Schmid M, Sollwedel A, Thuere C, Wafula P, Zenclussen ML, Müller DN, Gratze P, Woiciechowsky C, Volk HD, Zenclussen AC (2006): Murine pre-eclampsia induced by unspecific activation of the immune system correlates with alterations in the eNOS and AT1 receptor expression in the kidneys and placenta. *Placenta* (Epub ahead of print)

Schulz JB, Bremen D, Reed JC, Lommatzsch J, Takayama S, Wullner U, Loschmann PA, Klockgether T, Weller M (1997): Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J Neurochem* 69 (5): 2075-2086

Schulz M, Wacker J (2002): Epidemiologie der Präeklampsie. *Schwangerschaftshochdruck* Heilmann L, Rath W (Hrsh) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 215-222

Shibahara S, Muller RM, Taguchi H (1987): Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 25;262(27):12889-92

Sladek SM, Magnes RR and Konrad KP (1997): Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 272 (2): 441-463

Smith SC, Baker PN, Symonds EM (1997): Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 177:57-65

Snyder SH (1995): Nitric oxide: NO endothelial NO. *Nature* 377, 196-197

Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH (1998): Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4: 1073-1077

Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004): Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunol* 112(1):38-43

Staats J (1966): Nomenclature *Biology of the Laboratory Mouse* (ed. Green, E.L.) 45-50 McGraw-Hill, New York

Staats J (1976): Standardized nomenclature for inbred strains of mice: sixth listing. *Cancer Res* 36: 4333-77

Stark JM (1993): Pre-eclampsia and cytokine induced oxidative stress. *Br J Obstet Gynaecol* 100: 105-109

Stephenson MD (1996): Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 66(1):24-9



Stirrat GM (1990): Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. *Lancet* 336:673-5

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987): Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 27;235(4792):1043-6

Svensson L, Arvola M, Sallstrom MA, Holmdahl R, Mattsson R (2001): The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* 51:3-7

Tafari A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B (1995): T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 27;270(5236):630-3

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80 (2): 279-284

Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS (1999): TNF-alpha and IL-1 alpha induce heme-oxygenase-1 via protein kinase C, Ca<sup>2+</sup> and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol* 276: 1493-501

Tong X, Li S, Zhao Y (1998): Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in placental villus of preeclampsia . *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 33(9):527-8

Torrey DS, Mukherjee D (2003): Expression and function of placenta growth factor: implication for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 10:178–88

Townsend PA, Stephanou A, Packham G, Latchman DS (2005): BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *Int J Biochem Cell Biol* 37(2):251-9

Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM (2003): Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development *Biol Reprod* 68(5):1538-44

Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B (1996): Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7(3):240-4

Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J, Bachmann U, Lehmann M, Southard D, Iyer S, Schmidbauer G, Sawitzki B, Reinke P, Neuhaus P, Volk HD (2002): Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 74 (5):591-598

Urban G, Marinoni E, Di Iorio R, Lucchini C, Alo P, Di Tondo U (2001): New placental factors: Between implantation and inflammatory reaction. *Early Pregnancy* 5(1):70-1

Vedernikov YP, Graser T, Vanin AF (1989): Similar endothelium-independent arterial relaxation by carbon monoxide and nitric oxide. *Biomed Biochim Acta* 48(8):601-3

Vulapalli SR, Chen Z, Chua BH, Wang T, Liang CS (2002): Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2):H688-94

Wang YP, Yu YH (2002): Expression of endogenous heme oxygenase on surface of placental trophoblasts of pregnant women with intrauterine growth retardation of the fetus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22(7):637-9

Wang J, Rousseau DL, Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1994): Heme coordination of NO in NO synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(22):10512-6

Wegmann TG (1988): Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol Lett* 17(4):297-302

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993): Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14(7):353-6 Review

White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA (2004): Effect of Interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod* 70:123-31

White KA, Marletta MA. (1992): Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31:6627–31

Whittaker PG, Taylor A, Lind T (1983): Unsuspected pregnancy loss in healthy women. *Lancet* 1(8334):1126-7

Wollenberg I, Rebelo S, Zambon Bertoja A, Schuhmacher A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Woiciechowsky C, Volk HD, Soares M, Zenclussen AC (2006): Paternal HO-1 deficiencies might be responsible for increased abortion rates in the CBA/J x DBA/2J combination and this can be rescued by exposure to CO (in Vorbereitung)

Woo J, Iyer S, Cornejo M, Mori N, Gao L, Sipos I, Maines M, Buelow R (1998): Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase. *Transplant Immunol* 6: 84-93

Woo J, Iyer S, Mori N, Buelow R (2000): Alleviation of graft-versus-host disease after conditioning with cobalt-protoporphyrin, an inducer of heme oxygenase-1. *Transplantation* 4: 623-633.

Wood KJ, Sakaguchi S (2003): Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:199-210

Wooding FBP, Flint APF (1994): Plazentation. *Marshall's Physiology of Reproduction* 4<sup>th</sup> edn (Ed.G. E. Lamming), pp. 233-460 Chapman und Hall, New York USA

Xiang W, Chen H, Xu X, Zhang M, Jiang R (2005): Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the placentas of women with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 89(2):103-7

Yallampalli C, Garfield RE (1993): Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1316

Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, Sakahama H, Wang H, Tyagi S, Csizmadia E, Smith NR, Soares MP, Bach FH (2006): Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs *FASEB J* 20(6):776-8

Yoshiki N, Kubota T, Aso T (2000): Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 1136-1142

Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Peiser C, Klapp BF, Arck PC (2002): Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and IL-12 mediated murine abortion. *Scand J Immunol* 55: 560-569

Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC (2003): Heme Oxygenases In Pregnancy II: HO-2 is Downregulated in Human Pathological Pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 50: 66-76

Zenclussen AC, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC (2004): Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur J Immunol* 34(2):377-87

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Zambon Bertoja A, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD (2005): Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* 166(3):811-22

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD (2006): Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* 36(1):82-94

Zenclussen ML, Anegon I, Bertoja AZ, Chauveau C, Vogt K, Gerlof K, Sollwedel A, Volk HD, Ritter T, Zenclussen AC (2006): Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol* 69(1):35-52

Zenclussen AC (2006): Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 28(1):31-9

Zenclussen AC, Thuere C, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P, Fest S, Zambon Bertoja A, Sollwedel A, Casalis P, Wollenberg I, Bechmann I, Priller J, Volk HD (2006): Early generation of tolerance towards paternal antigens allows pregnancy success. *J Immunol* (in revision)

Zuckermann FA, Head JR (1986): Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. *Placenta* 7:349-364

## 9. Danksagung

Mein Dank geht als erstes an PD. Dr. Ana Zenclussen. Nicht nur für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit zu schreiben, sondern auch für die anregenden Diskussionen, die gute fachliche Anleitung und die gute Zusammenarbeit. Vielen Dank.

Prof. Dr. Hans Dieter Volk danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an seinem Institut zu arbeiten, an seinem Interesse für meine Arbeit, seine fachliche Expertise und Anregungen.

Bei Prof. Dr. Richard Lucius möchte ich mich dafür bedanken, dass er sich dazu bereit erklärt hat meine Doktorarbeit am Institut für Biologie zu betreuen.

Natürlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei all den vielen Kollegen bedanken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit begleitet haben. Ein ganz besonderes Dankeschön geht dabei an Annarosa Zambon Bertoja, Maria Laura Zenclussen und Pablo Casalis für die lange gemeinsame Arbeit im Labor, für die Hilfe bei den Tierversuchen und bei der Fehlersuche.

Catharina Thüre, Manuela Schmid und Paul Wafula möchte ich ebenfalls dafür danken, dass sie mir bei verschiedenen Gelegenheiten, wie dem stundenlangen Blutdruckmessen tapfer zur Seite gestanden haben.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung weder diese Arbeit, noch das Studium selbst möglich gewesen wären. Ich möchte mich bei ihnen für ihre unermüdliche Geduld bedanken, die sie mir all die Jahre entgegengebracht haben, ihre Liebe, ihre finanzielle Unterstützung, aber natürlich auch für das eine oder andere harte Wort, dafür Danke ich Jürgen und Christine Sollwedel.

## **10. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die Doktorarbeit: Der Einfluss der HO-1 Expression auf die Schwangerschaftskomplikationen spontaner Abort und Präeklampsie selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2007

André Sascha Sollwedel